

Transport von HIV-1 durch epitheliale Zellen
Identifizierung einer neuen funktionalen Domäne auf gp120

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Ing. (FH) Maren Helwig geb. Kracht

13.11.1971, Wuppertal

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Ph. D. Thomas Buckhout

Gutachter/ Gutachterinnen: 1. Prof. Dr. Richard Lucius

2. Prof. Dr. Georg Pauli

3. Prof. Dr. Lutz Gürtler

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2006

Zusammenfassung

Als ein Grund für die vertikale Transmission von HIV von der Mutter auf das Kind während der Schwangerschaft bzw. der Geburt wird der Transport von HIV durch die Eihaut diskutiert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen rezeptorvermittelten Transport, der auf einer Interaktion zwischen einer Lektin-bindenden Domäne auf dem viralen Oberflächenglykoprotein gp120 und einem Rezeptor auf der epithelialen Oberfläche beruht. In der vorliegenden Arbeit konnte die in den Transport von zellfreien HIV-1 durch epitheliale Zellen beteiligte Domäne auf gp120 erstmals näher charakterisiert werden. Überlappende Oligopeptide –basierend auf der Aminosäuresequenz von gp120– wurden zur Hemmung der Transzytose von HIV-1 durch humane Amnionzellen verwendet. Vier dieser Oligopeptide inhibierten die Transzytose von HIV-1 signifikant. Ein synthetisches Peptid (Env362-420) mit einer Länge von 59 Aminosäuren, welches die Sequenz der inhibierenden Oligopeptide darstellt, reduzierte die Menge an transportierten Viren ebenfalls, unabhängig vom HIV-1 Subtyp. Im Weiteren konnte der Transport von HIV-1 durch polyklonale Antikörper in Seren HIV-Infizierter, die mit Env362-420 reagierten, und durch Seren, die durch eine Immunisierung von Kaninchen mit Env362-420 gewonnen wurden, inhibiert werden. Antikörper gegen die in den Transport involvierte Domäne konnte in Seren HIV-Infizierter zu jedem Stadium der Infektion nachgewiesen werden. Bei einer Expression der Antikörper in der frühen Infektionsphase wäre ein positiver Einfluss auf die Prognose der Krankheit vorstellbar. Ob ein Zusammenhang zwischen einer Antikörperexpression gegen Env362-420 in HIV-infizierten Schwangeren und der Wahrscheinlichkeit einer HIV-Transmission auf das Kind besteht, muss noch geklärt werden. Env362-420 kann zur Identifizierung des Rezeptors auf der epithelialen Oberfläche, welcher in die Transzytose von HIV involviert ist, und zur Entwicklung von Inhibitoren der Mutter–Kind–Übertragung von HIV herangezogen werden.

Schlagwörter:

HIV
Mutter–Kind–Übertragung
Transzytose
gp120
Inhibierung

Abstract

The transport of HIV through the fetal membranes is discussed as one possible reason for the vertical transmission of HIV from mother to child during pregnancy or labor. HIV can penetrate epithelial barriers by a receptor-mediated transport mechanism involving interaction of a lectin-like domain on the viral glycoprotein gp120 and a receptor on the epithelial surface. In this study the domain on gp120 involved in transcytosis of cell-free HIV-1 through epithelial cells was characterized in more detail. Overlapping oligopeptides of gp120 were used to inhibit transcytosis of HIV-1 through an amnion cell monolayer. Four oligopeptides significantly inhibited transcytosis of HIV-1. A synthetic oligopeptide (Env362-420) with a length of 59 amino acids representing the sequence of the four inhibiting oligopeptides significantly reduced the transport of HIV, independent of the HIV-1 subtype. Furthermore, human HIV-positive sera with antibodies reacting with the domain Env362-420 and rabbit sera raised against the oligopeptide Env362-420 also inhibited the transport of HIV-1. Antibodies directed against the transcytosis domain could be detected in sera from every stage of infection. The development of these antibodies in the early stage of infection might play a role in the outcome of the HIV disease. It has to be investigated whether HIV-1-infected women who developed these antibodies show a lower rate of HIV transmission to their offspring than those without such antibodies. Env362-420 can also be used as a tool to identify the receptor involved in transcytosis on the epithelial cell surface and to develop inhibitors that could help prevent mother-to-child transmission of HIV during pregnancy or labor.

Keywords:

HIV
mother-to-child-transmission
transcytosis
gp120
inhibition

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrom</i> , erworbenes Immunschwäche Syndrom
Ak	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase – Anti Alkalische Phosphatase
ARC	<i>AIDS-related complex</i>
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	coding DNA, codierende DNA
CPE	cytopathischer Effekt
CV	Kristallviolett
DC-SIGN	<i>dendritic cell specific ICAM-grabbing non integrin</i>
D-MEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (äquimolare Mischung)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GalCer	Galactosylceramid
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> , Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke
l	Liter
LAS	Lymphadenopathisches Syndrom
LTNP	<i>long term non progressor</i>

m	Meter
M	Molar
mM	Millimolar (10^{-3} Molar)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Zahl der infektiösen Einheiten pro Zelle
N	Normal
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
NKS	neonatales Kälberserum
nm	Nanometer (10^{-9} m)
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sec	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SIA	<i>tissue culture infectious dose 50%</i> , 50% infizierte Gewebekultur
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose 50%</i> , 50% infizierte Gewebekultur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µM	Mikromolar (10^{-6} Molar)
U	Unit (Einheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HIV	1
1.1.1	Morphologie	1
1.1.2	Genomstruktur	2
1.1.3	Replikation von HIV-1	7
1.1.4	Krankheitsverlauf	10
1.1.5	Pathogenese	12
1.1.6	Epidemiologie der HIV-Infektion	13
1.1.7	Übertragungswege	13
1.2	Mutter-Kind-Transmission	14
1.2.1	Aufbau der menschlichen Eihaut	17
1.2.2	Transportmechanismen	18
1.2.3	Stand der Forschung	19
1.3	Aufgabenstellung	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.2	Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1	Expression von gp120	26
2.2.1.1	PCR-Reaktion: (Amplifizierung des <i>env</i> -Fragments)	26
2.2.1.2	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	28
2.2.1.3	Ligation	28
2.2.1.4	Herstellung Z-kompetenter <i>E.coli</i> XL1	28
2.2.1.5	Transformation Z-kompetenter <i>E. coli</i> XL1	29
2.2.1.6	Kolonie-PCR	29
2.2.1.7	Restriktionsanalyse	30

2.2.1.8	Sequenzierung der Klone	30
2.2.1.9	Umklonierung: <i>StrepTag</i> [®] -Kassette aus pASK-IBA-7 mit <i>env</i> -Sequenz in pFast His und pTriEx-3	31
2.2.1.10	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	32
2.2.1.11	Aufreinigung über Nickel-NTA	32
2.2.1.12	Aufreinigung über <i>Strep</i> -Tactin [®]	33
2.2.1.13	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	33
2.2.1.14	Western Blot.....	33
2.2.1.15	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.2.1.16	Kopplung an Beads	34
2.2.1.17	Proteinexpression im Baculovirus-System.....	34
2.2.1.18	Proteinexpression in Säugierzellen	35
2.2.2	Plasmid-Präparation	35
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	36
2.2.5	RNA-Extraktion	37
2.2.6	RT-PCR: Synthese von cDNA aus RNA	37
2.2.7	DNA-Extraktion.....	38
2.2.8	Quantitative Real-time PCR (TaqMan [™])	38
2.2.9	Standards für TaqMan [™] -PCR.....	40
2.3	Zellbiologische Methoden.....	42
2.3.1	Zellkultivierung.....	42
2.3.2	Virusanzucht.....	42
2.3.3	Durchführung der Transzytoseversuche.....	42
2.3.4	Gewinnung und Präparation von menschlicher Eihaut	44
2.3.5	CV-Test: Testung auf Dichtigkeit der FL-Filter	45

2.3.6	Bestimmung des Virustiters über Endstufentitration	46
2.3.7	Aufnahme und Abgabe von HIV-1	46
2.3.8	Synzythien-Inhibierungsassay (SIA).....	47
2.3.9	Deglykosylierung der humanen, monoklonalen Antikörper 2F5 und 2G12	48
2.3.10	Einfluss von Env362-420 auf Infektiosität.....	48
2.3.11	Nachweis der Bindung von Env362-420mod. an epitheliale Zellen.....	49
2.3.12	Alkalische-Phosphatase-anti alkalische-Phosphatase Technik (APAAP)	49
2.4	Serologische Methoden	50
2.4.1	Peptid-ELISA	50
2.5	Untersuchungen an mit Env362-420 immunisierten Kaninchen	54
2.5.1	Immunisierung und Boostern der Kaninchen.....	54
2.5.2	Charakterisierung der Immunseren	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Etablierung der TaqMan™-PCR-Systeme.....	57
3.2	Etablierung des Modellsystems zur Messung des Transports von infektiösen und physikalischen HIV-Partikeln	59
3.3	Werden auch nicht-infektiöse Partikel von der Epithelzelle transportiert?.....	60
3.4	Sind die verwendeten Epithelzellen mit HIV-1 infizierbar?	60
3.5	Hemmung der Transzytose durch humane monoklonale Antikörper	61
3.6	Bestimmung der minimalen Wirkkonzentration	62
3.6.1	Transzytose in Anwesenheit humaner monoklonaler Antikörper.....	62
3.7	Einfluss humaner Seren auf den Transport von Viren	66
3.7.1	Transzytose in Anwesenheit humaner Seren	66
3.7.2	Untersuchung der Seren und Plasmen auf neutralisierende Antikörper	71
3.8	Expression von gp120 in unterschiedlichen Expressionssystemen.....	72
3.8.1	Expression von gp120 in <i>E. coli</i>	72

3.8.2	Expression von gp120 im Baculovirussystem	73
3.8.3	Expression von gp120 in Säugerzellen	73
3.9	Identifizierung der in den Transport von HIV-1 _{IIIB} durch FL-Zellen involvierten Domäne auf gp120	74
3.9.1	Überlappende Oligopeptide von HIV-1	74
3.9.2	Transzytose in Anwesenheit der Oligopeptide ARP740.....	74
3.9.3	Transzytose in Anwesenheit des Peptids Env362-420.....	79
3.9.4	Transzytose durch CaCo-2 Zellen in Anwesenheit des Peptids Env362-420..	80
3.9.5	Einfluss des Peptids Env362-420 auf die Infektiosität.....	80
3.9.6	Inhibition der Transzytose von anderen HIV-1 Subtypen	81
3.9.7	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Env362-420 in humanen Seren/Plasmen	85
3.9.7.1	Untersuchung der verwendeten Seren auf Antikörper gegen das Peptid Env362-420	86
3.9.7.2	Untersuchung von Verlaufsseren auf Antikörpern gegen das Peptid Env362-420	87
3.9.7.3	Untersuchung von dokumentierten Serokonversionen auf Antikörpern gegen das Peptid Env362-420.....	88
3.9.8	Immunisierung von Kaninchen	91
3.9.9	Nachweis der Bindung von Env362-420mod. an epitheliale Zellen.....	94
3.9.10	Untersuchung der Transzytose von HIV-1 _{IIIB} im Eihautmodell	95
4	Diskussion	97
4.1	Inhibition des Transportes durch mono- und polyklonale Antikörper	98
4.2	Identifizierung der in den Transport involvierten Domäne auf gp120.....	104
4.3	Etablierung eines Peptid-ELISAs zur Untersuchung von Seren auf Antikörper gegen Env362-420.....	110
4.4	Entwicklung von Immunseren gegen Env362-420	116
4.5	Transzytose von HIV-1 _{IIIB} durch menschliche Eihaut	117

4.6 Zusammenfassung und Ausblick	118
Literaturverzeichnis.....	122
Anhang	137
Danksagung.....	145
Lebenslauf.....	146
Publikationen und Präsentationen	147
Eidestaatliche Erklärung	148

1 Einleitung

1.1 HIV

Anfang der 1980`ger Jahre wurde von den Arbeitsgruppen um Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und Robert C. Gallo am National Institute of Health in Bethesda die humanen Immundefizienz-Viren HIV-1 und HIV-2 als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert [Clavel *et al.* 1986, Gallo *et al.* 1984, Barre-Sinoussi *et al.* 1983, Gallo *et al.* 1983]. Diese Entdeckung zog eine enorme Forschungsaktivität nach sich, so dass heute viele Einzelheiten der Molekularbiologie und Pathogenese retroviraler Infektionen bekannt sind.

1.1.1 Morphologie

HIV-1 und HIV-2 sind bisher die alleinigen Vertreter der Lentivirusfamilie unter den humanpathogenen Retroviren. Infektionen durch Lentiviren verlaufen chronisch. Sie zeigen eine lange, klinische Latenzzeit, eine persistierende Virämie sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. HIV-1 und HIV-2 sind eng verwandt und weisen elektronenmikroskopisch die gleiche Morphologie auf, unterscheiden sich jedoch im Molekulargewicht ihrer Proteine und in der Anordnung der Regulatorgene auf dem Genom. HIV-1 wird in die drei Gruppen: M, N und O unterteilt. Die vorwiegend vorkommende HIV-1 Gruppe M (*major*) kann aufgrund von phylogenetischen Substrukturen in weitere Subtypen (A-D, F-H, J und K) unterteilt werden. Weltweit am häufigsten werden Subtyp C-Infektionen, in Nordamerika und Europa Subtyp B-Infektionen beobachtet. Bei HIV-2 unterscheidet man sechs Subtypen. HIV-2-Infektionen sind im Vergleich zu HIV-1-Infektionen seltener.

Die infektiösen Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm (Abb. 1). Das Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist [Earl *et al.* 1990, Gelderblom *et al.* 1987]. In ihr sind die viralen Glykoproteine integriert. Das transmembrane Protein (TM, gp41) ist über eine Region von ca. 20 hydrophoben Aminosäuren in der Lipiddoppelmembran verankert. Das so genannte externe Glykoprotein (SU, gp120) ist über nichtkovalente Bindungen mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil von gp41 mit der Virusoberfläche verbunden. Beide Glykoproteine sind durch Zuckergruppen modifiziert und werden als ein gemeinsames Vorläuferprotein gebildet. Die Spaltung und Bildung des aminoterminalen, externen und carboxyterminalen, transmembranen Anteils erfolgt während der Virusmorphogenese durch eine zelluläre, mit

dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat assoziierte Furin-Protease [McCune *et al.* 1988]. Die Matrixproteine (p17) sind über aminoterminal kovalent gebundene Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Die Matrixproteine verleihen dem Virion seine isometrische Struktur. Im Partikelinnern befindet sich das konische Viruskapsid, welches aus dem hydrophoben Kapsidprotein (p24) gebildet wird. Das Kapsidprotein sowie die Matrixproteine sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine). Die Kapside beinhalten zwei identische RNA-Moleküle mit je einer daran gebundenen Primer-tRNA, die retrovirale Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) und das kleine phosphorylierte, basische Nukleokapsidprotein (NC, p7). Das Nukleokapsidprotein ist mit der viralen, genomischen RNA komplexiert. Das Link-Protein (LI) verbindet das Kapsid mit der Hüllmembran [Gelderblom 1991].

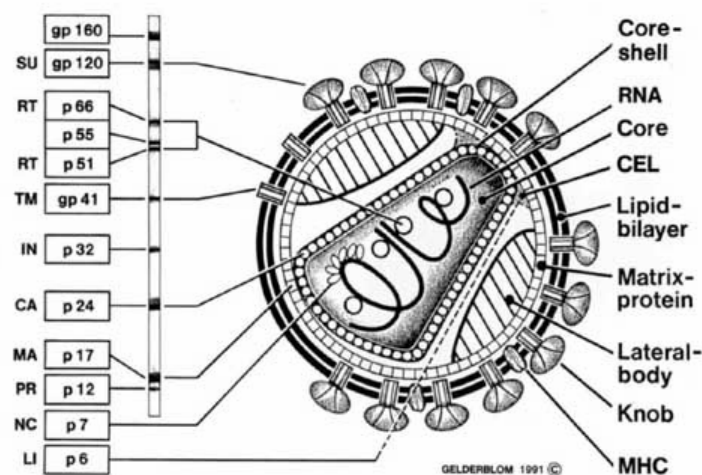


Abb. 1: Schematischer Aufbau von HIV-1: SU = Oberflächen-(surface) Protein, RT = Reverse Transkriptase, TM = Transmembranprotein, IN = Integrase, CA = Kapsidprotein, MA = Matrixprotein, PR = Protease, NC = Nukleokapsidprotein, LI = Verbindungsprotein (link), CEL = Core-envelope linker, MHC = Major histocompatibility complex; Teil der Membran der Zelle, in der sich das Virus vermehrt, Modell: Gelderblom 1991.

1.1.2 Genomstruktur

Im Wesentlichen benötigen replikationskompetente Retroviren nur drei Gene: *env* (*envelope*), *gag* (*group specific antigen*) und *pol* (*polymerase*). Nach Integration der proviralen DNA in die chromosomale DNA, werden diese Gene von der LTR (*long terminal repeat*)-Region flankiert. Die *env*- und *gag*-Gene codieren für die Glykoproteine der Virushülle bzw. für die internen Strukturproteine, das *pol*-Gen für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Die ca. 9,5 kb große RNA von HIV-1, die ein für eukaryontische

mRNA typisches 5'-Cap und einen 3'-Poly-A-Schwanz trägt, enthält zusätzlich noch 6 weitere Gene: *vif*, *vpu*, *vpr*, *rev*, *nef* und *tat*, die für regulatorische Proteine codieren (Abb. 2). Da *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* *in vitro* nicht wie *tat* und *rev* zur Replikation benötigt werden, bezeichnet man sie als akzessorische Gene.

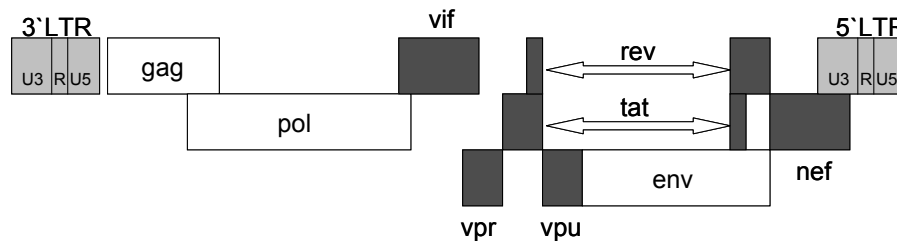


Abb. 2: Aufbau des proviralen HIV-1 Genoms: Das provirale Genom wird von den LTR-Elementen flankiert. Die offenen Leseraster (ORF; *open reading frame*) sind in Form von Kästchen dargestellt und exprimieren folgende Genprodukte: Strukturgene *gag* (*group specific antigen*) und *env* (*envelope*), Enzyme der *pol* (*polymerase*)-Region, akzessorische Proteine *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein R*), *vpu* (*viral protein U*) und *nef* (*negative factor*) sowie die regulatorischen Proteine *rev* (*regulator of expression*) und *tat* (*transactivator of transcription*)

LTR (long terminal repeat)

Die LTR-Bereiche des proviralen Genoms von HIV-1 bestehen aus zwei identischen DNA Sequenzen mit einer Länge von je ca. 600 Nukleotiden, die das provirale Genom flankieren. Man kann drei Bereiche der LTR unterscheiden: U3 (*unique region*) am 3'-Ende der RNA, R (*repeat region*) und U5 (*unique region*) am 5'-Ende der RNA (Abb. 2). Diese Bereiche beinhalten die für die Transkription von Retroviren charakteristischen Promotor- und Enhancerregionen [Rosen *et al.* 1985].

Gruppenspezifische Antigene (Gag-Proteine)

Zu den gruppenspezifischen Antigenen von HIV-1 gehören insgesamt 6 Proteine (p17 = MA, p24 = CA, p7 = NC, p6 = LI, p1 und p2), die als gemeinsames Vorläuferprotein (p55, 55 kD) synthetisiert werden. Von der viralen Protease wird das Vorläuferprotein während der Virusmorphogenese in die einzelnen Komponenten gespalten [Henderson *et al.* 1992]. Die Funktionen der Proteine p17, p24 und p7 sind bereits erwähnt worden. p6 enthält Sequenzen für das Ablösen der frisch gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche [Bess *et al.* 1992, South *et al.* 1990]. Die Funktionen von p1 und p2 sind noch unbekannt.

Enzyme (*pol*-Genprodukte)

Die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase werden vom *pol*-Gen codiert. Da das *pol*-Gen nicht über einen eigenen Translationsstart verfügt, wird es als Fusionsprotein mit dem Gag-Protein translatiert. Die Translation des Pol-Proteins ist erst nach Verschiebung des ribosomalen Leserasters am Anfang der Proteasesequenz möglich. Dieses Ereignis findet bei ca. 5% der Translationsvorgängen statt [Reil *et al.* 1993]. Das Gag/Pol-Fusionsprotein wird am Aminoterminal acetyliert und kann über diesen Myrestinrest mit der Plasmamembran assoziieren. Die Spaltung in die funktionellen viralen Enzyme durch die virale Protease erfolgt überwiegend erst bei der Virusreifung (Maturation) nach der Abknospung von der Zelloberfläche.

Protease: Die viruscodierte Protease führt die Proteolyse des Gag/Pol-Vorläuferproteins durch. Die ebenfalls in dem Polyprotein enthaltene Protease wird durch Autoproteolyse freigesetzt und prozessiert anschließend durch Hydrolyse weiterer Peptidbindungen des Fusionsproteins die virale Reverse Transkriptase und Integrase, sowie die Gag-Vorläuferproteine in die funktionell aktiven Gag-Proteine. Bei Blockierung dieses Prozesses werden morphologisch unreife, nicht-infektiöse Viren gebildet [von der Helm *et al.* 1996, Crawford & Goff 1985].

Reverse Transkriptase: Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und katalysiert unter Verwendung des (+)-RNA-Genoms des Virus den Einbau von Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTP) in einen (-)-DNA-Strang [Baltimore 1970]. Zudem besitzt das Enzym eine RNase H-Aktivität mit der die Degradation der (+)-RNA von dem (-)-DNA-Strang katalysiert wird [Coffin 1990]. Der (+)-DNA-Strang wird mit Hilfe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase Aktivität der RT generiert, es entsteht eine provirale, doppelsträngige DNA [Varmus & Swanstrom 1991].

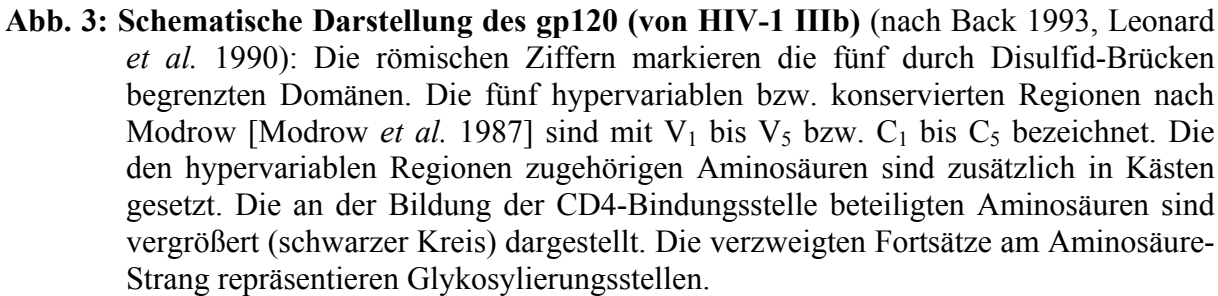
Integrase: Die Integrase besitzt sowohl eine Endonuklease- als auch eine Ligase-Aktivität. Zusammen mit der Reversen Transkriptase, dem Matrixprotein und dem vpr-Protein als Bestandteil des Präintegrationskomplexes [Farnet & Haseltine 1991] wird die Integrase unter ATP-Verbrauch in den Zellkern transportiert [Gallay *et al.* 1995, Heinzinger *et al.* 1994, Bukrinsky *et al.* 1992]. Im Kern ist die Integrase für den Einbau der proviralen DNA in die chromosomale DNA verantwortlich („Strang Transfer Reaktion“ [Brown *et al.* 1989]).

Membranproteine (*env*-Genprodukte)

Das Transmembran- (TM, gp41) und das Oberflächenprotein (SU, gp120) des viralen Hüllproteins wird vom *env*-Gen (*envelope*) codiert. Es wird als Vorläuferprotein (gp160) translatiert, im Golgi-Apparat glykosyliert und posttranslational von einer zellulären Protease (Furin) geschnitten. Die beiden Untereinheiten bleiben dabei durch nichtkovalente Wechselwirkungen untereinander verbunden. Der extrazelluläre Teil von gp41 enthält das für die Infektion notwendige „Fusionspeptid“. Gp120 enthält die Bindungsstellen für den CD4- und den Korezeptor [Lasky *et al.* 1987] und besitzt daneben die wichtigsten Determinanten für neutralisierende Antikörper [Javaherian *et al.* 1989]. Untersuchungen zur Transzytose von HIV-1 durch Epithelzellen haben gezeigt, dass gp120 die für den Transport notwendige Rezeptorbindung herstellt [Kage *et al.* 1998].

Struktur von gp120

Das gp120-Molekül weist eine komplexe Struktur auf, welche v.a. durch Disulfidbrücken bestimmt wird. Die Position dieser Disulfidbrücken ist bei allen bisher untersuchten Isolaten relativ konserviert [Leonard *et al.* 1990]. Durch diese Tertiärstruktur wird die Bindung an den zellulären CD4-Rezeptor ermöglicht und schafft die strukturellen Voraussetzungen im Vorläufermolekül gp160 für dessen Spaltung [Travis *et al.* 1992]. Die Disulfidbrücken markieren einige charakteristisch positionierte und strukturierte Unterabschnitte (Domänen) von gp120 [Hoxie 1991, Leonard *et al.* 1990, Modrow *et al.* 1987]. In der Abbildung 3 ist die Struktur mit der Domäneneinteilung dargestellt. Die Domänen weisen eine sehr unterschiedlich ausgeprägte Variabilität auf. In den sogenannten *hypervariablen Regionen* oder *hypervariablen Domänen* (V1 bis V5) findet man einen Anteil an konservierten Aminosäuren von weniger als 30% [Starcich *et al.* 1986, Willey *et al.* 1986]. Die genetischen Veränderungen in den fünf hypervariablen Abschnitten scheinen weitgehend unabhängig voneinander zu erfolgen [Pedroza Martins *et al.* 1992]. Die strukturelle Variabilität der Domänen V1 bis V3 ist größer als die der Domänen V4 und V5 [Lee *et al.* 1995]. Zwischen den hypervariablen Regionen liegen jeweils konserviertere Sequenzabschnitte (C1 bis C5).



Akzessorische Proteine

Das lentivirale **vif**-Gen (*viral infectivity factor*) codiert für ein stark konserviertes Protein, das für die effektive Reifung der Virionen nach Verlassen der Zellen notwendig zu sein scheint.

Das **Vpr**- Protein (*viral protein R*) scheint am Transport des Präintegrationskomplexes zum Nukleus beteiligt zu sein.

Das **Vpu**-Protein (*viral protein unknown*) verhindert die Komplexbildung des neu synthetisierten gp160 mit dem CD4-Protein im Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates, sodass CD4 degradiert und seine Oberflächenexpression verhindert wird [Willey *et al.* 1992]. Weiter ist das Vpu-Protein, welches kein Homolog in HIV-2 besitzt, für den effizienten Transport der Virionen aus der Zelle verantwortlich [Klimkait *et al.* 1990, Terwilliger *et al.* 1989].

Das früh im Replikationszyklus produzierte **Nef**-Protein induziert in den Zellen eine schnelle Herabregulierung von CD4 und MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Klasse I-Antigenen durch Endozytose [Collins *et al.* 1998, Aiken *et al.* 1994]. Hierdurch wird eine Superinfektion der Zellen verhindert, die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen wird gestört und ein „Entkommen“ vor dem Angriff zytotoxischer T-Zellen begünstigt [Harris 1999].

1.1.3 Replikation von HIV-1

Die Infektion der Zelle erfordert die spezifische Bindung des viralen Oberflächenmoleküls gp120 an das CD4-Molekül der Zielzelle, dem primären und notwendigen Rezeptor von HIV [McDougal *et al.* 1986, Dalgleish *et al.* 1984, Klatzmann *et al.* 1984]. CD4 ist ein monomeres Glykoprotein mit einer Größe von 58 kD und befindet sich auf der Oberfläche von CD4⁺-Zellen wie T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Gliazellen. CD4 ist der natürliche Ligand der MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Klasse II-Moleküle [Doyle & Strominger 1987]. Untersuchungen an CD4 exprimierenden murinen Fibroblasten zeigten, dass für eine effektive HIV-Infektion mindestens ein weiterer Zelloberflächenfaktor notwendig ist [Maddon *et al.* 1986]. Die Chemokinrezeptoren wurden kurze Zeit später als diese zellulären Kofaktoren charakterisiert. Die beiden für den Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle wichtigsten Korezeptoren sind CXCR4 [Endres *et al.* 1996, Feng *et al.* 1996] und CCR5 [Alkhatib *et al.* 1996, Choe *et al.* 1996, Deng *et al.* 1996, Doranz *et al.* 1996, Dragic *et al.* 1996]. Als Korezeptor T-zelltroper HIV-Isolate dient der CXCR4-Rezeptor [Feng *et al.* 1996], CCR5 wird von monozytotropen HIV-Isolaten [Deng *et al.* 1996, Doranz *et al.* 1996,

Dragic *et al.* 1996] bevorzugt. CXCR4 ist der natürliche Rezeptor für das Chemokin SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) [Bleul *et al.* 1996, Oberlin *et al.* 1996]), während CCR5 als Rezeptor sowohl für MIP-1 alpha und MIP-1 beta (*macrophage inhibitory protein*) als auch für RANTES (*regulated upon activation T-cell expressed and secreted*) dient [Murphy 1996]. Diese Chemokine konkurrieren mit HIV um die Bindungsstelle am Korezeptor und sind somit in der Lage, Zellen vor einer Infektion mit HIV zumindest partiell zu schützen [Bleul *et al.* 1996, Oberlin *et al.* 1996]. Neben diesen Chemokinrezeptoren scheint es noch weitere Korezeptoren wie z.B. CCR3 von Mikrogliazellen zu geben. CXCR4 und CCR5 sind jedoch die prädominanten Korezeptoren. Die Interaktion zwischen den Virushüllproteinen mit den zellulären Rezeptoren kann man wie folgt erklären: Gp120 bindet an CD4, dadurch wird eine Änderung der Konformation des gp120 induziert. Diese Änderung ermöglicht eine Interaktion des V3-Loops von gp120 mit dem jeweiligen Chemokinrezeptor und ist Voraussetzung für die nachfolgende Membranfusion [Doms & Peiper 1997]. Gp41 spielt bei dieser Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran eine zentrale Rolle. Hier kommt es ebenfalls zu einer Konformationsänderung, wobei es zu einer Insertion des hydrophoben NH-terminalen Endes in die Membran der Zielzelle kommt. Dieser Vorgang leitet die Fusion der viralen und zellulären Lipidmembranen ein. Durch die Verschmelzung der Membranen wird das Capsid in das Zytoplasma freigesetzt (Uncoating). Damit befindet sich der mit dem Kapsid und einem Teil der Matrixproteine assoziierte Nukleoproteinkomplex im Zytoplasma der Wirtszelle [Bukrinsky *et al.* 1993, Farnet & Haseltine 1991, Bowerman *et al.* 1989].

Die nun folgende Umwandlung der viralen RNA in provirale DNA im Zytoplasma der CD4⁺-Zelle mittels der Reversen Transkriptase ist ein kritischer Schritt im Lebenszyklus des Virus. Nach Eintritt von HIV in eine ruhende CD4⁺ T-Zelle und nach reverser Transkription der viralen RNA liegt das HIV-Genom nach Transport als Präintegrationskomplex in den Zellkern als provirale, nicht-integrierte HIV-DNA vor. Eine Aktivierung der infizierten Zelle ermöglicht erst die Integration der proviralen DNA durch das virale Enzym Integrase in die chromosomale DNA. Erst jetzt kann die Synthese neuer Virionen stattfinden [Zack *et al.* 1990]. Latent infizierte, ruhende CD4⁺ T-Zellen, die nicht-integrierte provirale DNA enthalten, stellen neben Monozyten, Makrophagen und Zellen des ZNS wichtige langlebige Virusreservoir dar [Chun *et al.* 1997].

Die Synthese neuer Virionen beginnt mit der Transkription der viralen mRNAs vom Provirus durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II. Initiiert wird die Transkription durch die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF-κB, die nach der

Aktivierung der Zelle durch Mitogene oder Zytokine induziert und in den Zellkern transportiert wurden, an ihre Bindungsstellen in der HIV-LTR. Diese initiale frühe Transkription führt zur Synthese der frühen regulatorischen HIV-Proteine wie z.B. Tat oder Rev. Die vollständigen HIV-Transkripte enthalten ein 5'-Cap und ein Poly-A-Ende und dienen sowohl als genomische RNA der neuen Virionen, als auch als mRNA für die Translation der Gag- und Gag-Pol-Polypoteine. Es entstehen weiter mehr als 30 alternativ gespleisste mRNAs, von denen die Env-Glykoproteine und die regulatorischen Proteine translatiert werden.

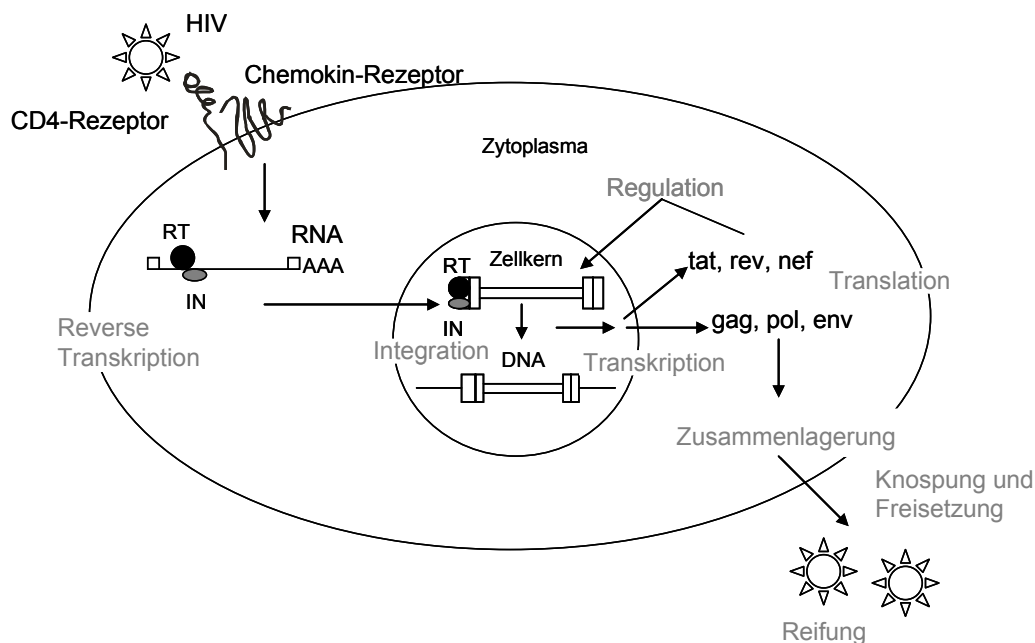


Abb. 4: Lebenszyklus von HIV innerhalb einer CD4⁺ T-Zelle: Darstellung der Vorgänge, die bei der HIV-Infektion einer CD4⁺ T-Zelle ablaufen. Zunächst gelangt das Virus nach Bindung an den CD4- und den Chemokin-Rezeptor in das Zytoplasma der Zelle. Nach Freisetzung des RNA-Genoms wird dieses durch die Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Im Zellkern vermittelt die virale Integrase (IT) die Integration der Virus-DNA in das Zellgenom. Die Provirus-DNA wird im Zellkern durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert und die Proteine im Zytoplasma translatiert. Tat, rev und nef führen nach Rücktransport in den Zellkern zu einer verstärkten Transkription. Es kommt zu einer Zusammenlagerung der Virusbausteine und des viralen RNA-Genoms mit anschließender Freisetzung unreifer Viruspartikel, die nach einer Reifung zu infektiösen Partikeln werden.

Der Zusammenbau der Viruspartikel findet an der Plasmamembran statt. Der erste Schritt ist die Bildung eines Nukleoproteinkomplexes aus genomischer RNA und tRNA^{Lys}, Gag- und Gag/Pol-Polypoteinen an der Zellmembran [Gelderblom 1991]. Dabei interagieren vermutlich die RNA und das Nucleokapsidprotein (NC) [Berkowitz & Goff 1994] sowie das

transmembrane Glykoprotein (TM, gp41) und Matrixprotein (MA) [Dorfman *et al.* 1994, Yu *et al.* 1992], um den Einbau aller notwendigen Proteine in die entstehenden Partikel zu gewährleisten. Die HIV-Protease wird erst während des „Buddings“ von der Zelle aktiviert, so dass die Vorläuferproteine nicht schon im Zytoplasma gespalten werden. Die von der Wirtszelle erworbene Lipidhülle des Virus zeigt gegenüber der Plasmamembran eine Anreicherung bestimmter Phospholipide und Cholesterol. Auch zelluläre Proteine werden selektiv integriert [Franke *et al.* 1994, Arthur *et al.* 1992, Gelderblom *et al.* 1987 II], dadurch werden die Viren vom wirtseigenem Komplementsystem nicht erkannt und zerstört [Kinoshita 1991]. Das „Budding“ kann je nach Zelltyp an unterschiedlichen Orten stattfinden. In Monozyten und Makrophagen wird HIV oft in zytoplasmatische Membransysteme hinein gebildet und häuft sich so in Vakuolen an. Bei den T-Zellen findet das Virusassembly *in vivo* als auch *in vitro* direkt an der Zelloberfläche statt [Gendelman *et al.* 1989, Orenstein *et al.* 1988].

1.1.4 Krankheitsverlauf

Die *Primärinfektion* mit HIV wird in den meisten Fällen nicht erkannt. In 40 bis 90% der akuten Infektionen treten vorübergehend grippeähnliche Symptome auf. Am Anfang der Infektion beobachtet man eine hohe Replikationsrate von HIV-1, was zur Induktion der virus-spezifischen Immunantwort führt. Dabei sinkt die Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten, den Zielzellen von HIV, auf unter 500 Zellen/ μ l ab, gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der CD8⁺-Zellen. Der CD4/CD8-Quotient kann dadurch zeitweise unter 1 absinken. Diese akute Phase der Infektion dauert in der Regel 7 bis 10 Tage an. Zu diesem Zeitpunkt ist nur ein Nachweis der Infektion über den HIV-Genomnachweis möglich, Antikörper gegen HIV sind in der frühen Phase noch nicht nachweisbar. Nach dieser akuten Phase der Erkrankung schließt sich eine über mehrere Jahre andauernde *symptomfreie (klinische) Latenzphase* mit einer stabilisierten Zahl an CD4⁺-Zellen an. Das sich der Latenzphase anschließende Stadium der *Lymphadenopathie* (LAS = Lymphadenopathisches Syndrom) zeichnet sich durch eine mehr als drei Monate andauernde Vergrößerung von mindestens zwei peripheren Lymphknoten aus und kann über mehrere Wochen bis Jahre andauern. Das Stadium der LAS kann in den *AIDS-related complex* (ARC) übergehen. Hier kommt es zu weiteren Symptomen wie z.B. Fieber und Gewichtsverlust, erste opportunistische Krankheiten können beobachtet werden. In dieser Zeit sind wie in den vorherigen Stadien HIV-spezifische Antikörper nachweisbar. Während der ARC kann die Zahl der CD4⁺-Zellen auf unter 400 Zellen/ μ l sinken. Fällt die Zahl der CD4⁺-Zellen weiter ab, die kritische Grenze liegt bei unter 200

Zellen/ μ l, kommt es zur Ausbildung des Vollbilds von AIDS. Hier beobachtet man aufgrund der Defekte in der Immunantwort wiederholte Ausbrüche von Erkrankungen mit opportunistischen Erregern, das Auftreten maligner Tumore und auch neurologische Symptome (HIV-bedingte Enzephalopathie). In dieser Phase sinken die im Blut nachweisbaren HIV-spezifischen Antikörper, vor allem gegen p24, und die Viruslast im peripheren Blut nimmt zu, wobei sich die Zahl der CD4⁺-Zellen weiter verringert.

Die Klassifikation der HIV-Erkrankung von den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in den USA unterscheidet drei klinische Kategorien und drei CD4-Zellzahlbereiche [CDC 1993]. Die Kategorie A definiert das asymptomatische Stadium der HIV-Infektion mit der akuten, primären HIV-Infektion und der persistierenden generalisierten Lymphadenopathie (LAS). Unter Kategorie B fallen Krankheitssymptome oder Erkrankungen, die nicht in Kategorie C fallen, jedoch ihre Ursache in der Störung der zellulären Immunabwehr durch die HIV-Infektion haben. Dazu gehören unter anderen andauerndes Fieber, lang anhaltende Durchfälle und rezidivierender *Herpes zoster*. Zur Kategorie C zählen die AIDS-definierten Erkrankungen wie z.B. die HIV-bedingte Enzephalopathie, das Kaposi-Sarkom und die Pneumocystis-Pneumonie. Die Einteilung der Labor-Kategorien erfolgt nach der CD4-Zellzahl: Patienten der Kategorie 1 besitzen mehr als 500 CD4⁺-Zellen/ μ l, der Kategorie 2 von 200 bis 499 CD4⁺-Zellen/ μ l und der Kategorie 3 weniger als 200 CD4⁺-Zellen/ μ l.

Zur Behandlung einer Infektion mit HIV stehen zurzeit Medikamente aus vier Wirkstoffklassen zur Verfügung: Inhibitoren der Reversen Transkriptase (Nukleosid- und Nukleotidanaloga = NRTIs und Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren = NNRTIs), Proteaseinhibitoren (= PIs) und mit dem Fusionshemmer T-20 wurde 2003 der Prototyp der vierten Substanzklasse, der Fusionshemmer, für die Behandlung zugelassen. Es werden zunehmend auch immunmodulatorische Ansätze mit Vakzinen oder Zytokinen wie Interferone und Interleukine erprobt. Mit allen Medikamenten ist eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs möglich, eine Heilung bisher jedoch nicht. Mit der üblicherweise angewendeten Kombinationstherapie mit zwei Nukleosidanaloga und einem Proteasehemmer konnte die Lebensqualität von HIV-Patienten gesteigert werden [Gortmaker *et al.* 2001]. Jedoch kann es bei der Einnahme dieser Medikamente zu starken Nebenwirkungen kommen. Ein weiteres Problem der antiretroviralen Therapie ist die Resistenzentwicklung von HIV gegenüber den eingesetzten Medikamenten [Chen *et al.* 2004].

1.1.5 Pathogenese

Bei einer Infektion gelangt das Virus entweder direkt ins Blut oder muss zunächst die Schleimhautbarriere des menschlichen Körpers überwinden. Bei einer dermalen und submukosalen Infektion wird vermutet, dass das Virus nach Überwindung der Barriere zunächst an DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*), ein C-Typ Lektin auf dendritischen Zellen, bindet und mit Hilfe dieser Zellen in das regionale, lymphatische Gewebe wandert. DC-SIGN und die Möglichkeit der Bindung zwischen DC-SIGN und gp120 wurde erstmals im Jahre 1992 beschrieben [Curtis *et al.* 1992]. DC-SIGN (CD209) wird auf verschiedenen Gruppen von dendritischen Zellen, wie z.B. der aus dem Blut stammenden Monozyten und dendritischen Zellen in der Nähe des genitalen Epitheliums, exprimiert. Das später entdeckte DC-SIGN Homolog DC-SIGNR, welches auf Endothelzellen im Sinus von Lymphknoten, in der Leber und der Plazentakapillaren vorkommt, kann ebenfalls an gp120 binden [Bashirova *et al.* 2001, Pöhlmann *et al.* 2001, Soilleux *et al.* 2000]. Durch Bindung an DC-SIGN und DC-SIGNR bleibt HIV über lange Zeit infektiös. Zudem kann durch die Bindung eine Infektion *in cis* von speziellen Makrophagen, die DC-SIGN, CD4 und einen Co-Rezeptor co-exprimieren, und *in trans* von T-Zellen vermittelt werden [Soilleux *et al.* 2003, Geijtenbeek *et al.* 2000].

In den Lymphknoten findet HIV CD4⁺ T-Zellen zur Infektion vor und stimuliert gleichzeitig die zellvermittelte und humorale Immunantwort. Auch während der Latenzphase findet in den Lymphknoten und in weiteren lymphatischen Organen wie Milz, Tonsillen und Peyersche Plaques eine aktive Virusreplikation statt. Durch Bindung der Viren an follikuläre dendritische Zellen wird verhindert, dass Viren die Lymphknoten verlassen. Die Lymphknoten sind zu dieser Phase der Infektion noch intakt. In den Keimzentren der Lymphknoten findet man eine Anreicherung HIV-infizierter Zellen sowie mit Antikörpern komplexierte Viren. Beim Übergang in die symptomatische Phase bricht das Gleichgewicht zwischen freigesetzten Viren und Eliminierung der Viren durch Antikörper zusammen. Aufgrund der hohen Mutationsrate von HIV und dem Selektionsdruck durch das Immunsystem werden Viren mit veränderten Oberflächenproteinen selektioniert. Damit ändern sich kontinuierlich ihre antigenen Eigenschaften sowohl für die humorale als auch für die zelluläre Immunreaktion und das Virus entgeht der Abwehrreaktion. Neben der Veränderung von HIV durch Mutationen kommt es zu einer Umstellung der Replikationseigenschaften, die Viren ändern ihren Zelltropismus. In der frühen Infektionsphase kann man hauptsächlich Viren, die sich *in vitro* langsam mit niedrigen Titern

vermehren und nur wenig Synzythien durch die gp120/CD4-vermittelte Fusion der Zellmembranen induzieren, isolieren. Diese Stämme verwenden als Korezeptor CCR5 und werden als NSI (*no syncytium induction*)-Stämme bezeichnet. Sie infizieren bevorzugt Makrophagen. Im Spätstadium findet man vermehrt Viren, die sich schnell mit hohen Titern replizieren und Synzythien induzieren, sogenannte SI (*syncytium induction*)-Stämme. Die SI-Stämme zeigen einen ausgeprägten Tropismus (Verwendung von CXCR4 als Korezeptor) für die Infektion der CD4⁺ T-Lymphozyten. Durch diese Tropismusänderung entziehen sich die Viren immer mehr der Immunantwort und können sich stark in den Lymphknoten vermehren. Die Lymphknoten werden zerstört und sowohl Viren als auch alle CD4⁺ Virus produzierenden Zellen gelangen ins periphere Blut. Als Folge kommt es auch im peripheren Blut zu einer starken Reduktion der CD4⁺-Zellen.

1.1.6 Epidemiologie der HIV-Infektion

In Deutschland lebten Ende 2005 ca. 49.000 Menschen mit HIV/AIDS, etwa 39.500 Männer, 9.500 Frauen und 300 Kinder. Die Zahl der Neuinfektionen pro Jahr war in Deutschland über lange Zeit nahezu konstant. Jedoch im Jahre 2005 beobachtete man einen Anstieg der Neuinfektionen von 2000 auf 2.600. Darunter fallen 2.250 Männer, 350 Frauen und weniger als 20 Kinder [Epidemiologisches Bulletin Robert Koch-Institut, 47/2005, http://www.rki.de/cln_011/nn_334076/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2005/47__05,templateId=raw,property=publicationFile.pdf] Viel dramatischer sieht die Entwicklung der HIV-Pandemie aus, Ende 2005 lebten nach Schätzungen von UNAIDS und der WHO weltweit etwa 40,3 Millionen Menschen mit HIV/AIDS, 95% der HIV-Infizierten leben in Entwicklungsländern. Darunter sind 38 Millionen Erwachsene und 2,3 Millionen Kinder unter 15 Jahren. Der Frauenanteil liegt im Gegensatz zu Deutschland bei den Erwachsenen bei ca. 50%. Im Jahr 2005 wurden weltweit 4,9 Millionen Menschen neu mit HIV infiziert darunter 4,2 Millionen Erwachsene und 700.000 Kinder unter 15 Jahren [UNAIDS, Dez 2005 aus dem Epidemiologisches Bulletin Robert Koch-Institut, 47/2005].

1.1.7 Übertragungswege

Bei HIV-Infizierten muss man von einer lebenslangen potentiellen Ansteckungsfähigkeit ausgehen. In den ersten Wochen der Infektion, bevor sich Antikörper gebildet haben, ist die Ansteckungsfähigkeit besonders hoch. Die Infektiösität nimmt in der Regel danach ab und erst im Stadium des fortgeschrittenen Immundefekts mit Auftreten der ersten klinischen Symptome erhöht sich die Infektiösität des Infizierten wieder. Die höchsten

Viruskonzentrationen findet man im Blut, in der Samenflüssigkeit und im Vaginalsekret. Da es sich bei Blut und dem männlichen Genitaltrakt um unterschiedliche Viruskompartimente handelt, kann aus einer unter der Nachweisgrenze liegenden Viruslast im Blut, nicht auf die Infektiosität in der Samenflüssigkeit geschlossen werden [Liuzzi *et al.* 1996]. Neben der Art und Dauer der Exposition sowie der Viruskonzentration hängt die Übertragungswahrscheinlichkeit noch von weiteren Faktoren wie der Virulenz des Erregers, der Übertragung von HIV-infizierten Zellen und der Immunantwort des Betroffenen ab. Neben Einzelfällen gibt es drei Hauptübertragungswege für eine HIV-Infektion: ungeschützter Geschlechtsverkehr, gemeinsamer Spritzengebrauch bei i.v.-Drogenabhängigen sowie die prä-, peri- oder postnatale (durch Stillen) Übertragung von der Mutter auf das Kind. Der Mechanismus, der zur prä- und perinatalen Infektion des Ungeborenen im Mutterleib führt, ist bis heute noch nicht gänzlich aufgeklärt.

1.2 Mutter-Kind-Transmission

Im Jahr 2005 wurden pro Tag weltweit ca. 2.000 Kinder unter 15 Jahren mit HIV infiziert [UNAIDS, WHO Dez. 2005]. Dabei lag der Grund für die Infektion hauptsächlich in der Übertragung von HIV während der Schwangerschaft oder zum Zeitpunkt der Geburt von der Mutter auf das ungeborene Kind. Die Anzahl der Schwangerschaften unter HIV-positiven Frauen wird in den nächsten Jahren weiter ansteigen, wenn man bedenkt, dass sich die Anzahl HIV-positiver Frauen zwischen 15 und 49 Jahren von 2003 bis 2005 um 1 Million auf 17,5 Millionen erhöht hat [UNAIDS, WHO Dez. 2005]. In Deutschland gestaltet sich die Situation weniger dramatisch. Hier ist jedoch nach Einführung der antiretroviralen Therapie und der damit verbundenen Verbesserung der Lebensqualität auch vermehrt mit Kinderwünschen von HIV-infizierten Frauen zu rechnen. Die Übertragungswahrscheinlichkeit während der Schwangerschaft einer HIV-infizierten Frau liegt ohne Präventionsmaßnahmen zwischen 15 und 25%. In Deutschland liegt die Transmissionsrate mit Präventionsmaßnahmen unter 1%. Die in Deutschland durchgeführten Präventionsmaßnahmen sind in den „Deutsch-Österreichischen Empfehlungen zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft“ [www.rki.de/INFEKT/AIDS_STD/BR_LINIE/BR_LINIE.HTM] festgelegt. Nach diesen Empfehlungen wird die Schwangere je nach Viruslast und CD4-Zellzahl antiretroviral behandelt. Das Kind wird unter Infusion eines NRTIs (meistens AZT) durch eine primäre Sectio vor Einsetzen der ersten Wehen entbunden. Nach der Geburt erhält das Kind ebenfalls eine prophylaktische antiretrovirale Therapie.

Ob eine Übertragung von HIV von der Mutter auf das Kind stattfindet, ist von einer Reihe von Faktoren abhängig. Zum einem spielt die Mutter eine Rolle, darunter fällt ihr Immunstatus, ihr Allgemeinzustand, Drogenkonsum, eventuell Vitamin A-Mangel, eine vorliegende genitale Herpesinfektion oder eine Serokonversion während der Schwangerschaft [Pitt *et al.* 2000, Semba *et al.* 1994, Clark *et al.* 1991, Grosch-Wörner *et al.* 1989]. Ebenso haben virus-abhängige Faktoren wie die Viruslast, besonders virulente HIV-Stämme und eine Resistenzentwicklung gegen die antiretroviralen Medikamente einen Einfluss auf die Transmission [Garcia *et al.* 1999, Kirchner 1999, Mayaux *et al.* 1997, Sutthent *et al.* 1997]. Das Übertragungsrisiko wird auch durch geburtshilfliche Faktoren wie eine frühe Ruptur der Eihaut, eine mit Verletzungen der Mutter einhergehende Geburt oder eine Sectio mit Blutkontakt des Kindes erhöht. Eine Steigerung des Risikos kann durch Infektionen wie eine Chorioamnionitis und vorzeitige Wehen erfolgen [Landesman *et al.* 1996]. Man findet bei HIV-infizierten Schwangeren eine erhöhte Rate (15-20%) an vorzeitigen Wehen und Komplikationen wie eine bakterielle Infektion der Eihäute.

Viele klinische Studien im Zusammenhang mit der primären Sectio vor Einsetzen der ersten Wehen bei HIV-infizierten Schwangeren haben gezeigt, dass der Zeitpunkt der Infektion des Kindes kurz vor der Geburt liegen muss. Die Ursache für das erhöhte Infektionsrisiko des Kindes nach Einsetzen der ersten Wehen könnte in einer lokal ansteigenden Virusreplikation liegen. Den Grund dafür kann wie folgt erklärt werden:

Im dritten Trimester der Schwangerschaft und kurz vor der Geburt kommt es in den Eihäuten, in der den Eihäuten anliegenden Dezidua sowie in der Plazenta zu einer vermehrten oder erst einsetzenden Produktion verschiedener Zytokine. Die Aufgabe der in dieser Schwangerschaftsphase produzierten Zytokine liegt in der Regulation der Prostaglandin-Produktion zur Einleitung der Geburt [Hansen *et al.* 1999]. Hierbei wirken die Zytokine auf die Biosynthese der Prostaglandine im Amnion [Bry & Hallman 1992, Romero *et al.* 1989], im Chorion [Lundin-Schiller & Mitchell 1991], in der Dezidua [Mitchell, Edwin & Romero 1990] und im Myometrium [Pollard & Mitchell 1996, Hertelendy *et al.* 1993] ein. In der Tabelle 1 sind die hauptsächlich im 3. Trimester und kurz vor der Geburt sezernierten Zytokine der Eihäute und der Dezidua aufgeführt [Bowen *et al.* 2002].

In der Dezidua kommt es ausschließlich im 3. Trimester und kurz vor der Geburt zur Produktion von IFN γ , IL-2 und IL-10, in den Eihäuten zur Produktion von IFN γ , IL-1 α/β , IL-6 und TNF- α/β . Diese Zytokine können bekanntlich die HIV-Replikation stimulieren (Tabelle 1, adaptiert nach Fauci *et al.* 1993). Durch diese Zytokine werden HIV-infizierte

Zellen aktiviert, NF- κ B wird als zellulärer Transkriptionsfaktor in den Zellkern transportiert und bindet dort an die Bindungsstelle auf der HIV-LTR. Mit dieser Bindung an die HIV-LTR wird die Transkription der viralen RNA vom Provirus initiiert. HIV-infizierte Makrophagen befinden sich in der unmittelbaren Nähe der fetalen Membranen und es kann zu einer stark ansteigenden lokalen Produktion an infektiösem HIV kommen.

Tab. 1: Sezernierte Zytokine der Dezidua, des Amnions und des Chorions während des 3. Trimesters und kurz vor der Geburt einer normalen Schwangerschaft und deren Einfluss auf die Replikation von HIV.

Zytokine	Dezidua	Eihaut		Einfluss auf HIV-Replikation	
		Chorion	Amnion	T-Zellen	Makrophagen
<u>Interferone</u>					
IFN α	+	+	—	↓	↓
IFN β	+	—	—	↓	↓
IFN γ	+	+	+	↑/↓	↑/↓
<u>inflammatorische Zytokine</u>					
IL-1 α/β	+	+	+	↑	↑
IL-6	+	+	+		↑
TNF- α/β	+	+	+	↑	↑
<u>TGF-β Superfamilie</u>					
TGF- β 1	+	—	—	↑	↓
TGF- β 2	+	—	—	↑	↓
<u>hematopoetische Wachstumsfaktoren</u>					
IL-3	+	—	—		↑
M-CSF	+	—	—		↑
<u>von Lymphozyten abgeleitete Vermittler</u>					
IL-2	+	—	—	↑	
<u>anti-inflammatorische Zytokine</u>					
IL-4	+	—	—	↓	↓
IL-10	+	—	—		↑/↓

(+ = ausschließlich 3. Trimester/Geburt, + = meist 1. und 3. Trimester/Geburt, — = werden nicht sezerniert, Einfluss auf HIV-Replikation: ↑ gesteigerte Replikation, ↓ verringerte Replikation), IFN (*interferon*), IL (*interleukin*), TNF (*tumor necrosis factor*), TGF (*transforming growth factor*), M-CSF (*Macrophage-colony stimulating factor*)

Die Trennung zwischen den lokal produzierten HI-Viren und dem Fetus stellen die fetalen Membranen = menschliche Eihäute dar. Im folgenden Kapitel wird der Aufbau der

Membranen aufgezeigt und die auf diesen Aufbau basierende Möglichkeit für die Viren, die Barriere zwischen der mütterlichen und der fetalen Seite zu überwinden.

1.2.1 Aufbau der menschlichen Eihaut

In der Abbildung 5 ist der Aufbau der menschlichen Eihaut dargestellt.

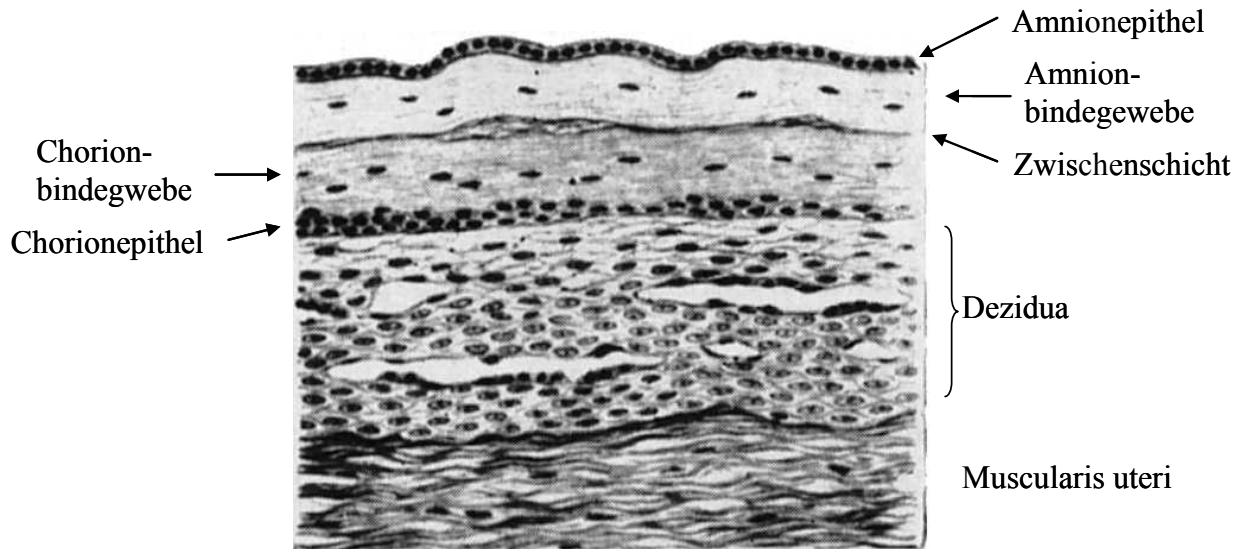


Abb. 5: Aufbau der menschlichen Eihaut (aus Pschyrembel Klinisches Wörterbuch Version 2002, Copyright ©2001 Walter de Gruyter GmbH & Co. KG), die Eihaut setzt am Rand der Plazenta an und besteht aus zwei fetalen Schichten (Amnion und Chorion) sowie einer maternalen Schicht (Dezidua).

Die Eihaut, welche die äußere Hülle der Fruchtblase darstellt, besteht aus einem fetalen und dem anliegenden mütterlichen Anteil. Der fetale Anteil besteht aus dem Amnion und dem Chorion mit dem dazwischenliegenden „spongy layer“ = Zwischenschicht. Der mütterliche Anteil – die Dezidua – wird aus dem Endometrium gebildet und liegt dem Chorion an [Schmidt 1992]. Die Dezidua ist sowohl reich an mütterlichen Blutgefäßen als auch an Monozyten und Makrophagen, die bei einer HIV-infizierten Schwangeren potentiell infiziert sein können. Die anliegende Chorionschicht besteht aus einem 2 bis 8-reihigen Epithel – dem Trophoblasten – mit verschiedenen Zelltypen. Das sich dem Epithel anschließende Chorionbindegewebe besteht aus Interzellulärsubstanz und Fibroblasten, diese Schicht trägt hauptsächlich zur mechanischen Stabilität bei. Zwischen den Chorion- und Amnionbindegewebe befindet sich das sogenannte „spongy layer“, eine dünne flüssigkeitsreiche Schicht, die neben Kollagenfibrillen und Fibroblasten auch Makrophagen enthält. Das sich anschließende Amnionbindegewebe besteht aus Grundsubstanz mit

eingelagerten Fibroblasten und Makrophagen (Hofbauer Zellen). Den Abschluss der Eihaut zum Fruchtwasser hin bildet das Amnionepithel, welches aus einer einzigen Lage an Epithelzellen besteht.

1.2.2 Transportmechanismen

Sowohl die Amnion- als auch die Chorionschicht besteht neben Bindegewebe aus Epithelzellen, die aufgrund der Ausbildung von „cell junctions“ eine undurchlässige Barriere bilden. Durch diese undurchlässige Barriere ist ein Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind, der hauptsächlich über die Plazenta aber auch über die Eihaut stattfindet, nur durch aktive Transportmechanismen der epithelialen Zellen möglich. Die Epithelien der Eihaut werden von polarisierten Epithelzellen gebildet. Ein Charakteristikum polarisierter Zellen ist die Einteilung der Plasmamembran in zwei diskrete Regionen. Durch „tight junctions“ wird die Plasmamembran in einen apikalen und einen basolateralen Bereich unterteilt. Beide Kompartimente der Zelle unterscheiden sich in ihrer Struktur und in ihrer Funktion. Sie verfügen über unterschiedliche Transportproteine und können unterschiedliche Transportprozesse ausführen. Ein weiteres Charakteristikum ist aufgrund der Polarisierung die Aufnahme von Makromolekülen z.B. auf der apikalen Seite und der aktive Weitertransport im Zellinnern. Die Abbildung 6 zeigt unterschiedliche Wege die ein über die apikale Plasmamembran durch Bindung an einen zellulären Rezeptor in „early endosome“ aufgenommenes Molekül durchlaufen kann. Unter Punkt 1 ist der Recycling-Weg dargestellt, hier wird das aufgenommene Molekül wieder zur apikalen Plasmamembran zurücktransportiert. Punkt 2 zeigt den Transport des aufgenommenen Moleküls vom endosomalen Kompartiment zu den Lysosomen, wo die Degradation des Moleküls stattfindet. Die Transzytose wird unter Punkt 3 dargestellt. Das über Rezeptorbindung aufgenommene Molekül wird über Transportvesikel durch die Zelle zur basolateralen Plasmamembran, wo die Exozytose erfolgt, transportiert. Man kann postulieren, dass der Mechanismus der Transzytose beim Transport von HIV durch die Eihaut eine Rolle spielt. Im Gegensatz zur Transzytose von Viren ist die Transzytose von Bakterien besser untersucht. *E. coli*, *Haemophilus influenzae* und Gruppe B-Streptokokken werden unter Beteiligung von Komponenten des Zytoskeletts (Mikrotubuli und Mikrofilamente der Zellen) an der apikalen Seite von epithelialen und endothelialen Zellen aufgenommen, in intrazellulären Vakuolen zur basolateralen Seite transportiert und dort ausgeschleust [Kallman & Kihlstrom 1997, Nizet *et al.* 1997, Meier *et al.* 1996, Panigrahi *et al.* 1996].

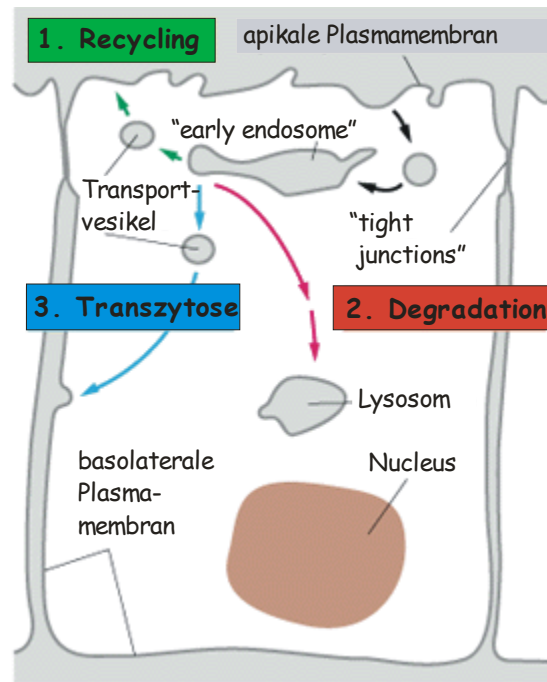


Abb. 6: Transportmechanismen der polarisierten Epithelzelle (Abbildung aus: Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts und James D. Watson: Molecular Biology of the Cell 1994.)

1.2.3 Stand der Forschung

In Infektionsstudien mit Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit zellfreien simianen Immundefizienzvirus (SIV) oder chimären simianen-humanen Immundefizienzvirus (SHIV) nach Aufbringen auf die intakte Mukosa des Mauls, der Vagina und des Rektums möglich ist [Sodora *et al.* 1998, Baba *et al.* 1996, Lu *et al.* 1996]. In der Arbeitsgruppe um Morgane Bomsel wurden Transzytoseversuche mit HIV-infizierten mononukleären Zellen in einem *in vitro*-Modell mit Epithelzellen durchgeführt. Durch Kontakt zwischen Epithelzellen und HIV-infizierten Zellen kommt es zu einer massiven und schnellen Ausschleusung der Viren aus den infizierten Zellen, einer Aufnahme der Viren und einem Transport durch die Epithelzellen [Bomsel 1997]. Bei der Transzytose von HIV durch Epithelzellen handelt es sich um einen schnellen Transport. Wie bei der Transzytose von Bakterien spielt das Zytoskelett der Zelle dabei eine entscheidende Rolle. Durch Inkubation der Zellen mit Colchicin, welches die Mikrotubuli depolymerisiert, kann der Transport von HIV inhibiert werden. Die Transzytoserate von zellgebundenen Viren kann in Anwesenheit von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) und noch effizienter von sekretorischen Immunglobulinen der Klassen A (IgA) und M (IgM) reduziert werden [Bélec *et al.* 2001, Broliden *et al.* 2001, Devito *et al.* 2000, Hocini *et al.* 1999, Hocini *et al.* 1997]. Die

Neutralisation erfolgt intrazellulär in den Endosomen unter Beteiligung eines konservierten Epitops von gp41 [Bomsel *et al.* 1998]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch zellfreie HI-Viren sowohl Monolayer von Epithelzellen als auch Eihäute mittels einer rezeptorvermittelten Transzytose durchdringen können [Kage *et al.* 1998, Rokos *et al.* 1998]. HIV-1 kann *in vitro* von polarisierten Mundschleimhautzellen aufgenommen und als infektiöse Viren wieder freigesetzt werden [Kage *et al.* 1998]. Latexpartikel, die mit nativen gp120 beschichtet waren, werden ebenfalls über die Transzytose durch primäre Epithelzellen transportiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die für den Transport notwendige Domäne von HIV auf gp120 liegt. Dabei weisen weitere Versuche daraufhin, dass der Transport von infektiösem, zellfreien HIV ein cAMP (*cyclic adenosin monophosphat*)-abhängiger Mechanismus ist, der auf einer Wechselwirkung zwischen der Lektin-Domäne von gp120 und Mannosylresten von Glykoproteinen auf der mukosalen Oberfläche beruht. Aufgrund der Lektin-bindenden Eigenschaft von gp120 ist die Transzytose durch Oligosaccharide, wie sie z.B. in Form von Mucin im menschlichen Speichel vorkommen, zu hemmen. Der zelluläre Rezeptor ist noch nicht identifiziert. Versuche haben jedoch gezeigt, dass weder der CD4-Rezeptor noch die Korezeptoren CXCR4 und CCR5 beim Transport von HIV eine Rolle spielen [Hocini *et al.* 2001, Kage *et al.* 1998].

1.3 Aufgabenstellung

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte der Mechanismus des Transportes von HIV durch Epithelzellen als erster Schritt einer Infektion näher untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf dem Transport von HIV durch die Eihaut als initialer Vorgang der Übertragung von HIV von der Mutter auf das Kind während der Schwangerschaft. Die Infektion des Kindes kurz vor der Geburt könnte wie folgt erklärt werden: Mit einsetzenden Wehen kommt es zu einer vermehrten Bildung u.a. bestimmter die HIV-Replikation aktivierender Zytokine in der der Eihaut anliegenden Dezidua und in der Eihaut selbst. Die aufgrund der resultierenden Aktivierung der HIV-infizierten Zellen lokal produzierten zellfreien HI-Viren können nun durch Transzytose durch die Eihaut transportiert werden und ins Fruchtwasser gelangen. Die Eihaut verfügt über Zellen, die aufgrund ihres Clathringerüsts zum Transport von Makromolekülen durch die Zelle, also auch zur Transzytose von HIV-1, befähigt sind. Zu einer Infektion des ungeborenen Kindes kommt es ebenfalls durch Transport der Viren durch die Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes nach Verschlucken des Fruchtwassers, durch die Epithelzellen des Respirationstraktes nach Einatmen von Fruchtwasser und durch die Epithelzellen der Haut.

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen auf einem rezeptorvermittelten Transport hin, wobei die Wechselwirkung zwischen einer postulierten Lektin-bindenden Domäne auf dem Hüllglykoprotein gp120 von HIV mit Mannosylresten von Glykoproteinen auf der epithelialen Oberfläche eine Rolle spielen könnte. In der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung der Domäne auf gp120, welche in Wechselwirkung mit einem zellulären Rezeptor tritt und somit die Transzytose einleitet, im Vordergrund. Dafür wurde ein *in vitro*-System zur Untersuchung der Transzytose von zellfreien HIV durch Amnionepithelzellen etabliert. Durch Untersuchungen mit humanen monoklonalen Antikörpern, die gegen neutralisierende Epitope auf gp120 und gp41 gerichtet sind, und Seren HIV-infizierter Patienten sollte die Möglichkeit der Hemmung dieses Transportes durch Antikörper untersucht werden. Mit geeigneten Methoden sollte die in den Transport von HIV-1 durch Amnionzellen beteiligte Domäne auf dem gp120-Molekül identifiziert werden. Zu Beginn der Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Charakterisierung der Domäne auf gp120 diskutiert: Expression von gp120 in geeigneten Expressionssystemen und Verwendung des von Kage *et al.* [Kage *et al.* 1998] beschriebenen Transportsystems und an Beads gekoppeltes gp120. Die Eingrenzung der Domänen sollte dann durch Generierung von Mutanten (Deletionskartierung) erfolgen. Als alternativer Ansatz wurde die Hemmung der Transzytose von infektiösem HIV durch Oligopeptide angesehen. Da im Falle der gp120-gekoppelten Beads nicht mit infektiösen Viren umgegangen werden musste, wurde dieser Versuchsansatz zuerst erprobt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Eukaryonte Zellen

Molt 4/8	Klon 8 der humanen akuten T-Lymphoblastischen Leukämie-Zelllinie Molt 4
CEM × 174	Fusionsprodukt der humanen B-Zelllinie 721-174 und der humanen T-Zelllinie CEM
CACO-2	Colon, humanes colorectales Adenokarzinom
FL	humane Amnionzellen
293	humane epitheliale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 DNA
Hep G2	Leber, humanes Hepatocellularkarzinom
Hela	Zellen eines humanen epithelialen Adenokarzinoms des Gebärmutterhalses
HT29/B6	Colon, humanes colorectales Adenokarzinom

Verwendete Viren Laborstämme

HIV-1 _{IIIB}	HIV-1 _{BRU} (LAV-1), Acc. Nr. K02013
HIV-1 Gruppe O	MVP5180, Acc. Nr. L20571, Primärisolat ² , adaptiert an Molt4/8-Zellen

Referenzisolate (HIV-1)

Subtyp	Isolatbezeichnung	Datenbankeintrag (Acc. Nr.)
A	11562/96	kein Eintrag ^{1,2}
C	484/97	kein Eintrag ^{1,2}
D	3971/95	kein Eintrag ^{1,2}
D	92UG024 ³	U08805
F	93BR020 ³	AF005494
G	ARP/173RU570 ³	U08368
O	HIV-1 CA-9 ³	X96522

¹ Bei den Subtypen, die noch keinen Datenbankeintrag besitzen, wurden bei den Sequenzvergleichen auf Sequenzen zurückgegriffen, die in der Arbeitsgruppe bestimmt wurden (C. Kücherer, persönliche Mitteilung).

² Primärisolate, von L. Gürtler, Universität Greifswald zur Verfügung gestellt.

³ HIV-1-Isolate vom NIH AIDS Research and Reference Reagent Program

Bakterienstamm

E. coli XL1-Blue (Stratagene GmbH) Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lac^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]

Enzyme

Taq-DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*, InViTek, Berlin), DNA-Polymerase Combi Pol™ (InViTek, Berlin), T4-DNA-Ligase (Promega, Deisenhofen), Superscript Reverse Transkriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Alkalische Phosphatase (Promega, Deisenhofen), Restriktionsenzyme: PstI, Bam HI, Hind III, Bgl II, Nde I, Sac I, Xba I (Promega, Deisenhofen), Uracil-N-Glykosylase = UNG (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), N-Glykosidase F (Roche, Mannheim)

Plasmide

pBlueskript II SK(+): (pBSSK⁺, Stratagene, USA): Fl (-) ori, ColE1 ori, LacI (nicht funktionell), lacZ (für Blau-Weiß-Selektion), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T3- und T7-Promotoren, Ampicillinresistenz, Größe: 3,0 kb

pBT1/BS: pBSSK⁺-Vektor mit proviralem HIV-1_{III_B} Genom (LAI Acc. Nr. K02013 [Wain-Hobson *et al.* 1985]), dessen LTR Sac-I geschnitten ist, Ampicillinresistenz, Größe: 12,0 kb

pQE-90s: basiert auf pQE-Vektor von Qiagen, C-terminaler His-Tag

pFast His: basiert auf pFastBac1-Vektor (Life Technologies) zur Herstellung rekombinanter Baculoviren durch „site-specific“ Transposition in *E. coli*, C-terminaler His-Tag

pTriEx 3: (Novagen Inc., Darmstadt) durch drei Promotoren: T7lac, p10 und CMV Expression in Bakterien, Insektenzellen (Baculoviren) und Mammaliensystem, C-terminaler His-Tag und HSV-Tag, Ampicillin-Resistenz, Größe: 3,7 kb

pASK-IBA 6: (IBA GmbH, Göttingen) N-terminaler Strep-Tag[®], periplasmatische Lokalisation des rekombinanten Proteins, Ampicillin-Resistenz, ori, tet-Promotor, tet-Repressor, Größe: 3,3 kb

pASK-IBA 7: (IBA GmbH, Göttingen), N-terminaler Strep-Tag[®], cytosolische Lokalisation des rekombinanten Proteins, Ampicillin-Resistenz, ori, tet-Promotor, tet-Repressor, Größe: 3,2 kb

pEGFP-N3: (Clontech, Palo Alto, USA), codiert für GFP (Green Fluorescence Protein)

pCR[®]II-TOPO-Cloning Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Oligonukleotide (TibMolBiol, Berlin, metabion GmbH, Martinsried)

Die verwendeten Primer und Sonden sind im Methodenteil unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

Kulturmedien und Zusätze

Dulbeccos modified Eagle Medium D-MEM (Gibco BRL, USA), fötales Kälberserum FKS (Gibco BRL, USA), Glutamin 2mM (Gibco BRL, USA), Natrium-Pyruvat (Gibco BRL, USA), Nicht-essentielle Aminosäuren NEAA (Gibco BRL, USA), PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen), RPMI 1640-Medium (Gibco BRL, USA), Trypsin/ EDTA (PAA Laboratories GmbH, Österreich, 0,5/0,5 (w/w) in PBS 1×)

Chemikalien

Agarose (peQ Lab, Erlangen), Ampicillin, Bisindolylamilorid, Chlorpromazin, β -Cyclodextrin, Cytochalasin D, Dimethylamilorid, EDTA, SDS, Tris, Wortmannin (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Anhydrotetracyclin AHT (IBA GmbH, Göttingen), Agar (Oxoid GmbH, Wesel), Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL, USA), Bacto-Trypton (Gibco BRL, USA), Bovines Serumalbumin BSA (Merck, Darmstadt), Bromphenolblau (Bromma, Schweden), Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck, Darmstadt), Ethanol (Merck, Darmstadt), Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg), Ficoll[®] 400 (Serva, Heidelberg), Formalaldehyd (Merck, Darmstadt), Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside IPTG (BTS Bio Tech, St. Leon), Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt), Kristallviolett CV (Fluka, Schweiz), Lipofectin (Qiagen, Hilden), 5 × Loading Buffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt), Natriumacetat (Merck, Darmstadt), Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), Triton (Serva, Heidelberg), Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt), Tween 20 (Fluka, Schweiz)

Technische Geräte

Blotting-Apparatur (Fast-Blot, Biometra, Göttingen), Elisa-Lesegerät (Easy Reader, EAR 400AT, SLT Lab Instruments, Österreich), Feuchtbrutschrank (Heraeus, Thermo Electron, Langenselbold), Immunfluoreszenzmikroskop Axiovert 2000 mit Software AxioVision 3.1 (Zeiss, Jena), Gradientenzykler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg), Lichtmikroskop ID02 (Zeiss, Jena), Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg), Laborzentrifuge (Sorvall, Thermo Electron Langenselbold), Spektrometer (LKB Ultrospec III, Pharmacia), Gelelektrophorese-Kammer horizontal (Horizon 58, Gibco BRL, USA), SDS-

Gelelektrophorese-Kammer vertikal (Mini V 8-10 Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, BRL Life Technologies, Inc. USA), TaqMan[®] ABI 7700 (Perkin Elmer, USA), Videodokumentationssystem (Herolab GmbH, Wiesloch), Zykler DNA Engine MJ Research PTC 200 Peltier Thermal Cycler (Biozym, Oldendorf), Neubauer Zählkammer (Brand GmbH und Co KG, Wertheim)

Materialien für Zellkultur/ Eihautpräparation

Nitrozellulosefilter 0,3 µm Porendurchmesser für 24-Lochplatten PET (BD Falcon[™], USA), Nitrocellulosefilter 8 µm Porendurchmesser für 6-Lochplatten (Corning Costar, Niederlande), Zellkulturflaschen 25 und 75 cm² (TPP[®], Schweiz), Zellkultur Testplatte 6, 12 und 24 well (TPP[®], Schweiz), Nystatin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Penicillin/Streptomycin (Biochrom KG, Berlin), sterile Handschuhe zur Befestigung der Eihaut am Kunststoffring (Größe 7,5, Ansell, USA), Kunststoffringe aus Hostaphon POM (22 mm Durchmesser, 12 mm Breite, Firma Reli, Berlin), Clip-Zange (Fa. Pilling Weck, USA), Titanligaturclips (Größe: mittel, AD. Krauth, Hamburg), Aterienklemmen (Aesculap, B. Braun Melsungen AG)

Materialien zur ELISA-Etablierung

Murex HTLV I + II-ELISA (Abbott GmbH und Co KG, Wiesbaden), Peroxidase konjugierter Anti-human IgG Antikörper von der Ziege (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), neonatales Kälberserum NKS (Gibco BRL, USA), Harnstoff (Merck, Darmstadt), Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt), Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen IgG Antikörper von der Ziege (Dianova, Hamburg), 96-Loch-Maxisorb[®]-Immunoplaten (Nunc GmbH und Co KG, Wiesbaden)

Materialien für Western Blot

4-Chloro-1-Naphtol, Triethanolamin (beide Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), H₂O₂ (Merck, Darmstadt), Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen IgG Antikörper von der Ziege (Dianova, Hamburg)

Antikörper für APAAP

Brücken-Antikörper Anti-Maus IgG aus der Ziege (Dianova, Hamburg), APAAP-Komplex aus der Maus (Dianova, Hamburg)

Materialien für Immunisierung der Kaninchen

Freundsches Adjuvans komplett und inkomplett (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

Materialien für Immunfluoreszenztest

L-Lysin (Serva, Heidelberg), FITC konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper aus der Ziege (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Expression von gp120

Zur Proteinexpression wurden drei unterschiedliche Expressionssysteme und damit verbunden auch unterschiedliche Expressionsvektoren verwendet. In der Tabelle 2 sind die Expressionssysteme zusammengestellt:

Tab. 2: Verwendete Expressionssysteme

Expressionssystem	Plasmid	Signalpeptid	Aufreinigung über
<i>E. coli</i>	pQE-90s	ohne	His-Tag
	pTriEx 3	mit	His-Tag
Baculovirus	pFast His	mit	His-Tag
	pTriEx 3	mit	His-Tag
Mammalian System (Säugerzellen)	pTriEx 3	mit	His-Tag
	pASK-IBA 6	mit	<i>Strep</i> -Tag [®]
	pASK-IBA 7	mit	<i>Strep</i> -Tag [®]

2.2.1.1 PCR-Reaktion: (Amplifizierung des *env*-Fragments)

Die PCR wurde zur Amplifizierung der für die Klonierung benötigten *env*-Fragments verwendet. Dabei wurden über die eingesetzten Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen eingeführt, um somit die Klonierung der erhaltenen DNA-Fragmente in das jeweilige System zu ermöglichen.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine routinemäßig angewendete Methode zur Amplifizierung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase [Saiki *et al.* 1988, Mullis *et al.* 1986]. Die Reaktion wird in drei Schritte unterteilt: DNA-Denaturierung, Bindung und Hybridisierung eines Primer-Paares am 3'- und am 5'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes und die Synthese der neuen DNA durch die hitzestabile DNA-Polymerase. Diese Reaktionsfolge wird in der Regel 20 – 30 mal wiederholt, so dass

der gewünschte DNA-Abschnitt in exponentiell steigender Menge synthetisiert wird. Die optimalen Reaktionsbedingungen (Inkubationszeit und -temperatur, Konzentration der einzelnen Komponenten) sind von der jeweiligen Primer-Template-Kombination abhängig und müssen für jede Reaktion optimiert werden. Ein PCR-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten: einer DNA-Polymerase mit dazugehörigem Puffer, Desoxynukleosidtriphosphate = dNTP (mit den vier notwendigen Nukleotiden: Adenosin (dATP), Thymin (dTTP), Guanin (dGTP) und Cytosin (dCTP)), Magnesiumchlorid $MgCl_2$ und die jeweiligen Primerpaare. Um hier die zeitaufwendige Optimierung der PCR zu umgehen, wurden die PCR-Ansätze mit unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentration (1, 2 und 3 mM) angesetzt. Für die Amplifikation wurden folgende vom Expressionssystem abhängigen Primer verwendet (Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen):

Tab. 3: Zur Amplifizierung des *env*-Fragmentes verwendete Primer.

Expressions-vektor	Primer	Primersequenz
pQE-90 s	<i>env</i> pQE-s	5`-GAT CCC <u>TGC AGA</u> CAG AAA AAT TGT GGG TC-3`
	<i>env</i> pQE-r	5`-GAT CCC <u>TGC AGT</u> CTT TTT TCT CTC TGC ACC AC-3`
pFast His, pTri Ex-3,	HIV 5800/Bam-s	5`-GCG <u>TGG ATC CGT</u> GGC AAT GAG AGT GAA GG-3`
pASK-IBA 6/7	HIV 7350/Bam-r	5`-GAT GTG <u>GAT CCT</u> CTT TTT TCT CTC TGC ACC AC-3`

Unterstrichen sind die Schnittstellen für PstI (in *env* pQE-r und *env* pQE-s) und BamH I (in HIV 5800/Bam-s und HIV 7350/Bam-r)

Als Template wurde das Plasmid pBT1/BS (100 ng/Ansatz) verwendet, welches das komplette HIV-1 LAI-Genom [Wain-Hobson *et al.* 1985] mit Deletionen in der LTR beinhaltet. Die Amplifikation erfolgte im Gradientenzykler nach folgendem Programm: Denaturierung bei 94°C für 2 min 20 sec, 4 Zyklen mit Hybridisierung (40 Sekunden 46 +/- 4°C), Synthese (2 Minuten 72°C) und Denaturierung (20 Sekunden 94°C), 30 Zyklen mit Hybridisierung (20 Sekunden 94°C), Synthese (2 Minuten 72°C) und Abschluss der Synthese 20 Minuten 72°C. Nach Ablauf der Reaktion wurde eine analytische Gelelektrophorese (siehe 2.2.3) durchgeführt, um Ausbeute, Reinheit und Größe des amplifizierten Fragments zu überprüfen. Stimmte die Größe des Fragments mit der zu erwartenden Größe überein, wurde das Fragment über das „PCR-Purification-Kit“ von Qiagen, Hilden nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.2.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Die für das Vektorsystem pQE-90s amplifizierten Fragmente wurden - wie der Vektor - für die Klonierung mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten, für die anderen Vektorsysteme mit BamHI. Die Restriktion erfolgte nach Vorschrift des Enzymherstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Fragmente mit Hilfe des „PCR-Purification-Kit“ von Qiagen aufgereinigt. Die einzelnen Vektoren wurden vor der Ligation dephosphoryliert, auch hierbei wurde nach der Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Nach der Dephosphorylierung wurden die Vektoren über ein präparatives Agarose-Gel gereinigt und die Menge an geschnittenen Vektor und Fragment anschließend über ein analytisches Agarose-Gel bestimmt.

2.2.1.3 Ligation

Linearisierte DNA-Fragmente mit überhängenden, komplementären Enden wurden in „sticky end“-Ligation mit der T4 DNA Ligase verknüpft. Dabei wurde das einzuligierende Fragment in ca. dreifach molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.1.4 Herstellung Z-kompetenter *E.coli* XL1

Die Präparation transformationskompetenter *E. coli* wurde mit dem „Z-competent Buffer Set“ (Zymo-Research, Kalifornien) durchgeführt. Hierzu wurden 50 ml SOB-Medium mit 500 µl einer frischen *E. coli* XL1 Übernachtskultur angeimpft und bei Raumtemperatur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 – 0,3 geschüttelt. Nach Pelletieren der auf 4°C abgekühlten Kultur wurde das Zellpellet mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen und dann in 5 ml „Competent-Puffer“ aufgenommen. Gelagert wurden die kompetenten Zellen aliquotiert bei –70°C.

SOB-Medium	
Bakto-Trypton	2,0 % (w/v)
Bakto-Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	8,6 mM
KCl	2,5 mM
in aqua bidest	
pH 7,0	

2.2.1.5 Transformation Z-kompetenter *E. coli* XL1

100 µl der kompetenten Zellen wurden mit 5 µl Ligationsansatz gemischt und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aufgrund des Resistenzgens in den jeweiligen Plasmiden können über die LB^{amp}-Platten die transformierten Bakterien selektiert werden.

LB-Medium	
Bakto-Trypton	1,0 % (w/v)
Bakto-Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	172 mM
in aqua bidest	
pH 7,0	

2.2.1.6 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, ob die transformierten Bakterien Plasmide mit *env*-Sequenz beinhalten, wurde eine Kolonie-PCR angesetzt. Folgende Primer, die die C2V5-Region von HIV-1 amplifizieren, wurden verwendet:

Tab. 4: Primer zur Kolonie-PCR

Primer	Primersequenz
6537s	5'-AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA C-3'
7254as	5'-CCA ATT GTC CCT CAT ATC TCC TCC TC-3'

Die PCR-Reaktion wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Als Template wurde mit einer sterilen Eppendorf-Spitze bzw. Zahnstocher eine Kolonie auf der LB^{amp}-Platte gepickt und in die Reaktionslösung gebracht. Daraufhin wurde die PCR-Reaktion unter den nachfolgenden Bedingungen durchgeführt. Die amplifizierten Produkte wurden anschließend über eine analytische Gelelektrophorese ausgewertet.

Tab. 5: Bedingungen zur Kolonie-PCR

1 ×	Denaturierung	2 Minuten	94°C
30 ×	Denaturierung	1 Minute	94°C
	Hybridisierung und Synthese	2,5 Minuten	65°C
1 ×	Abschluss der Synthese	10 Minuten	68°C

2.2.1.7 Restriktionsanalyse

Eine weitere Methode zur Überprüfung, ob die transformierten Bakterien das Plasmid mit der gewünschten *env*-Sequenz tragen, ist die Restriktionsanalyse. Zusätzlich ist es möglich, mit dieser Methode die Orientierung des eingebauten *env*-Fragmentes zu beurteilen. Hierzu werden die aus den transformierten Bakterien isolierten Plasmide mit den in der Tabelle 6 aufgeführten Restriktionsenzymen mit den jeweiligen Puffern nach Vorschrift des Herstellers für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Tab. 6: Restriktionsenzyme und -muster zur Restriktionsanalyse der Klone

Plasmid	Restriktionsenzyme	Restriktionsmuster (Größe der einzelnen Fragmente in kb)
pQE90s	Nde I, Hind III	1,6 und 3,7 kb
	Bgl II	5,1 und 0,2 kb
pBSSK ⁺	Bam HI	1,9 und 2,9 kb
pFast His	Bgl II	0,15; 0,47; 0,6; 1,7 und 3,1 kb
pTri Ex-3	Nde I	1,0; 1,7 und 3,8 kb
pASK-IBA 6/7	Bgl II, Pst I	0,16; 0,6 und 4,0 kb

Anschließend wurden die Ansätze über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Tabelle 6 sind die jeweiligen Restriktionsmuster bei korrektem Einbau aufgeführt.

2.2.1.8 Sequenzierung der Klone

Zur Überprüfung der *env*-Sequenz in der extrahierten Plasmid-DNA wurde eine Sequenzierung nach der Didesoxykettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger *et al.* 1992] durchgeführt. Das Prinzip einer Polymerase-Ketten-Reaktion mit einem kontrollierten basenspezifischen Abbruch der enzymatischen Replikation durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphat-Analoga (ddNTP), denen am 3'-Ende eine OH-Gruppe fehlt, wurde dazu verwendet („cycle sequencing“). Die DNA-Fragmente wurden anschließend über ein 4,8 %iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel, welches eine Auftrennung der Fragmente mit nur einer Base Unterschied erlaubt, aufgetrennt. Durch Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe während des Gel-Laufs entsteht ein Sequenzierungsmuster, das über ein Computerprogramm (Apple, Ismaning) ausgewertet wurde. Die Sequenzdaten wurden mit den Programmen Sequence Analysis, MT Navigator und Autoassembler ausgewertet. Anschließend wurden die Sequenzen mit dem Blast-Programm über die NCBI-Homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) mit der öffentlichen

Datenbank verglichen. In den nachfolgenden Tabellen sind der Sequenzierungsansatz und das PCR-Programm zur Sequenzierung angegeben.

Tab. 7: Sequenzierungsansatz

BigDye™ Sequenz-PreMix (ABI, Weiterstadt)	3,0 µl
Primer (12 µM)	1,0 µl
Plasmid-DNA (300 bis 500 ng)	x µl
H ₂ O	ad 10 µl

Tab. 8: PCR-Programm Sequenzierung

1 ×	Denaturierung	2 Minuten	94°C
28 ×	Denaturierung	15 Sekunden	96°C
	Hybridisierung	15 Sekunden	55°C
	Synthese	4 Minuten	60°C

Für die Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet:

Tab. 9: Sequenzierungsprimer

Primer	Primersequenz
6537 s	5'-AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT ACA C-3'
7254 as cons	5'-CCA ATT GTC CCT CAT ATC TCC TCC TC-3'
2 s	5'-TTA ATT GTG GAG GGG AAT TTT TCT-3'
2 as	5'-AGA AAA ATT CCC CTC CAC AAT TAA 3'
5 as cons	5'-TCC TTG GAT GGG AGG GGC ATA CAT TGC-3'
pQE s	5'-CGC CCT GCC ACT CAT CG-3'
pQE r	5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'
env6380r	5'-TGT TAC AAC TTG TCA ACG TAT AGC TGG TAG-3'

Die Primer wurden so gewählt, dass die Sequenz in beiden Richtungen überprüft werden konnte.

2.2.1.9 Umklonierung: *StrepTag*®-Kassette aus pASK-IBA-7 mit *env*-Sequenz in pFast His und pTriEx-3

Um bei der Expression im Baculovirussystem und in Säugerzellen ebenfalls die Möglichkeit der Aufreinigung über einen *StrepTag*® zu haben, wurde die *Strep*-Tag®-Kassette mit *env*-Sequenz aus pASK-IBA 7 in den pFast His-Vektor direkt und in den pTriEx 3-Vektor über pBSSK+ kloniert. Hierzu wurden die Vektoren pFast His, pASK-IBA 7 und pBSSK+ mit den Restriktionsenzymen XbaI und Hind III nach Protokoll geschnitten. Die geschnittenen

Vektoren und das *StrepTag*[®]-*env*-Fragment wurden über Gelextraktion aufgereinigt. Die *StrepTag*[®]-*env*-Kassette wurde wie beschrieben in pFast His und pBSSK+ ligiert. Zur Klonierung der Kassette in pTriEx-3 wurde sowohl pTriEx-3 als auch pBSSK+ mit SacI und Hind III verdaut. Die Ligation und die weiteren Schritte erfolgten wie vorher beschrieben.

2.2.1.10 Proteinexpression in *E. coli*

Nach Klonierung und Überprüfung der Sequenz wurde das infrage kommende Plasmid, welches die komplette *env*-Sequenz in richtiger Orientierung trägt, in *E. coli* transformiert und das rekombinante gp120 exprimiert. Hierzu wurde LB^{amp}-Flüssigmedium mit den transformierten *E. coli* angeimpft (Verhältnis 1:50 bis 1:100) und bei 200 UpM bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 wachsgelassen. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Nullwert entnommen, die Bakterien hierzu pelletiert, in Ladepuffer (5 × Loading Buffer, MBI, Fermentas) resuspendiert, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und bei -20°C eingefroren. Um den Abbau der Proteine zu verhindern, wurde den jeweiligen Proben ein Protease-Inhibitor (complete[™] Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Boehringer Mannheim) hinzugefügt. Die restliche Kultur wurde bei pQE 90s mit 2mM IPTG inokuliert und bei pASK-IBA mit 2 µg/l AHT. IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) inhibiert den lacIq-Repressor auf pQE 90s und das rekombinante Protein kann exprimiert werden. Bei pASK-IBA wird der tetA-Promotor durch AHT (Anhydrotetracyclin) optimal induziert. Nach 2 bis 3 Stunden wurden weitere Proben entnommen, die wie der Nullwert behandelt wurden. Die entnommenen Proben wurden anschließend über eine SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe der Coomassie Brilliant Blue-Färbung bzw. eines Western Blots auf das rekombinante Protein hin untersucht.

2.2.1.11 Aufreinigung über Nickel-NTA

Durch die Klonierung des *env*-Fragmentes in den pQE-Vektor trägt das rekombinante Protein eine Sequenz von 6 Histidinen am 3'-Ende. Die Affinität der 6×His-Sequenz zu Ni²⁺-Ionen wurde zur Aufreinigung über Ni-Agarose ausgenutzt. Die Aufreinigung erfolgte wie im Handbuch zum „QIAexpressionist-Kit“ (Qiagen, Hilden) beschrieben. Hierbei wurden die rekombinanten Proteine unter denaturierenden und nativen Bedingungen im kleinen Ansatz über Säulen und im großen Ansatz über eine FPLC-Anlage aufgereinigt.

2.2.1.12 Aufreinigung über *Strep-Tactin*[®]

Durch die Klonierung des *env*-Fragmentes in den pASK-IBA 6 und 7 Vektor trägt das rekombinante Protein ein *Strep-Tag*[®] und kann über *Strep-Tactin*[®] aufgereinigt werden. Die Aufreinigung des rekombinanten gp120 erfolgte mit dem „*Strep-Tag*[®] Starter-Kit“ (IBA GmbH, Göttingen) nach Vorschrift des Herstellers.

2.2.1.13 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung aller bei den unterschiedlichen Methoden zur Proteinexpression entnommener Proben auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins wurden diese über eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli [Laemmli 1970] aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Hierzu wurden ein 5 %iges Sammelgel und ein 7,5 %iges Trenngel verwendet. Als Marker zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine diente Mark 12™ Unstained Standard (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und der pre-stained Protein Standard SeeBlue[®] Plus2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Gele liefen im SDS-haltigem Laufpuffer. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt oder die aufgetrennten Proteine mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens auf Nitrocellulosemembran transferiert.

2.2.1.14 Western Blot

Die Proteine im SDS-Gel wurden mit dem elektrischen Transfer in der Blotting-Apparatur Fast-Blot (Biometra, Göttingen) im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Gibco BRL[®], USA) aufgebracht. Die rekombinanten Proteine wurden mit unterschiedlichen Antikörpern nach den Protokollen der jeweiligen Hersteller nachgewiesen.

Tab. 10: Verwendete Systeme zur Identifizierung der gp120-Bande im Western Blot

Plasmid	Antikörper	nachgewiesen wird:	Hersteller
pQE 90s, pTriEx-3, pFastHis	Penta-His HRP Konjugat	His-Tag	Qiagen, Hilden
pASK-IBA	Strep-Tactin alkaline phosphatase Konjugat (ST-AP)	<i>Strep</i> -Tag [®]	IBA GmbH, Göttingen
alle Plasmide	polyklonale Antikörper aus HIV-Positiv-Kontrolle [*]	gp 120	Genelab [®] , Singapur

^{*} Zum direkten Nachweis von gp120 wurde ein Western Blot mit der Positiv-Kontrolle aus Genelab[®] HIV-1 Western Blot (Genelab[®], Singapur) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Protokoll wurde insofern abgeändert, dass statt der mitgelieferten Blotstreifen die hergestellten Nitrozellulosemembranen eingesetzt wurden.

2.2.1.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Menge an rekombinanten Protein nach Aufreinigung über Ni-NTA bzw. *Strep*-Tactin[®] wurde mit dem „BCA Protein Assay“ (Pierce Biotechnology, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe herangezogen, welche bei jeder Bestimmung parallel angesetzt wurde. Die Standardreihe bestand aus einer Verdünnungsreihe einer Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100, 20 und 0 µg/ml.

2.2.1.16 Kopplung an Beads

Zur Untersuchung der Transzytose wurde das aufgereinigte gp120 an fluoreszierende Mikropartikel (Fluoresbrite[™] carboxy NYO 0,1 micron Microspheres, Polysciences, Inc. Europe, Eppenheim) kovalent gekoppelt. 200 bis 400 ng der Proteine wurden nach der „Carbodiimide“ Methode („Carbodiimide Kit for Carboxylated Microparticles“, Polysciences, Inc. Europe, Eppenheim) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Da die Mikropartikel aufgrund ihrer Größe durch eine Zentrifugation nicht zu pellettieren waren, musste die Kopplung mit Hilfe des *MicroKros Hollow Fiber Filter*-Systems (Polysciences, Inc Europe, Eppenheim) erfolgen. Auch hier wurde nach der Vorschrift des Herstellers gearbeitet.

2.2.1.17 Proteinexpression im Baculovirus-System

Die Proteinexpression im Baculovirus-System wurde am Deutschen Rheuma Forschungszentrum, Berlin in der Forschungsgruppe Molekularbiologie unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. Roland Lauster durchgeführt. Die Untersuchung auf Expression von gp120

über Western Blot und die Aufreinigung über Nickel-NTA wurde am Robert Koch-Institut durchgeführt. Um den Abbau der Proteine zu verhindern wurde den jeweiligen Proben ein Protease-Inhibitor (complete™ Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Boehringer Mannheim) hinzugefügt.

2.2.1.18 Proteinexpression in Säugerzellen

Zur Proteinexpression in Säugerzellen wurden unterschiedliche Zelllinien: 293, HeLa und Hep G2 mit den Plasmiden pTriEx 3 und pTriEx-*Strep* transfiziert. Hierzu wurden ca. 5 bis 6×10^5 Zellen in eine 25 cm²-Zellkulturflasche eingesät und bis zu einer 20-40 %igen Konfluenz wachsen gelassen. Die Transfektion wurde mit Lipofectin (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll mit 4 µg Plasmid pro Ansatz durchgeführt. Als Transfektionskontrolle wurde pro Ansatz 400 ng pEGFP mit transfiziert. Durch Transfektion von pEGFP kommt es zu einer frühen Expression des Green Fluorescence Protein (GFP), welches im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Als Kontrolle wurden die Zellen mit pBSSK+ transfiziert. Die Zellen und der Zellüberstand wurde nach vier Tagen abgenommen und auf die Expression von gp120 mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und APAAP hin untersucht. Um den Abbau der Proteine zu verhindern wurde den jeweiligen Proben ein Protease-Inhibitor (complete™ Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Boehringer Mannheim) hinzugefügt.

2.2.2 Plasmid-Präparation

Die Präparation erfolgte aus Zellpellets frischer 3 ml-Übernachtskulturen mit dem „Nucleospin-Kit“ (Macherey und Nagel, Düren) nach Protokoll des Herstellers. Zur Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine 100 ml-Kultur mit dem „JET Star 2.0 Plasmid Maxi Kit“ (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen) aufgearbeitet. Die Konzentration der extrahierten Plasmid-DNA wurde anschließend durch Messung im Photometer bestimmt.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Analytische Gelelektrophorese

Nach Mischen der DNA-Proben mit 10fach Probenpuffer wurde die DNA gelelektrophoretisch bei 5-10V/cm in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (Gibco/BRL, USA) mit 1×TAE-Laufpuffer in 0,8 bis 2 %igen Agarose-Gelen in

Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente in 1×TAE mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA wurde ein Marker (100bp Ladder plus, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit aufgetrennt. Die Agarosegele wurden anschließend mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Herolab GmbH, Wiesloch) nach Visualisierung mit UV-Licht (366 nm) dokumentiert und ausgewertet [Sambrook *et.al* 1989].

Präparative Gelelektrophorese

Die Reinigung der Vektoren nach dem Restriktionsverdau erfolgte über präparative Agarose-Gele. Die Auftrennung wurde wie bei der analytischen Agarose-Gelelektrophorese beschrieben durchgeführt. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem „JETquick Gel Extraction-Kit“ von Genomed, Bad Oeynhausen nach Angaben des Herstellers präpariert.

10 × TAE-Puffer		10fach Probenpuffer	
Tris	400 mM	Ficoll 400	25 % (v/v)
EDTA	10 mM	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Natriumacetat	500 mM	in 10 × TAE-	
in aqua bidest		Puffer	
pH 7,9			

2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

durch eine photometrische Bestimmung:

Der Gehalt an DNA kann über eine photometrische Messung bestimmt werden. Das Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger bzw. 37 µg/ml einzelsträngiger Nukleinsäure. Die Reinheit der Probe kann durch eine zusätzliche Messung bei 280 nm (halbmaximale Extinktion von Nukleinsäuren und Absorptionsmaximum von Proteinen) und der Quotientenbildung aus der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt werden. Liegt dieser Quotient zwischen 1,6 und 2,0 ist eine Verunreinigung mit Proteinen auszuschließen.

durch Ethidiumbromidfärbung im Agarose-Gel:

Die zu bestimmende DNA und ein DNA-Konzentrationsstandard (λ Hind Marker, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurden dazu elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel geeigneter Konzentration aufgetrennt. Über einen Vergleich der Bandenintensitäten konnte die Konzentration der DNA abgeschätzt werden.

2.2.5 RNA-Extraktion

RNA wurde aus den Proben der Transzytoseversuche mittels des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) extrahiert. Zur Extraktion der RNA aus dem Medium aus dem unteren Kompartiment der Transzytoseversuche (siehe 2.3.3) wurde das Protokoll zur „RNA clean-up“ mit Modifikationen verwendet. 100 μ l der jeweiligen Proben wurden mit zunächst 350 μ l RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol und danach mit 250 μ l 98 % Ethanol versetzt. Diese Mischung wurde in eine „QIA spin column“ überführt und diese 15 sec bei 8000 \times g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend zunächst mit 700 μ l Waschpuffer RW 1 und danach zweimal mit alkoholhaltigem RPE-Puffer gewaschen. Eluiert wurde die RNA mit 30 μ l *E. coli* t-RNA-haltigem Wasser (0,1 mg tRNA/ml, tRNA aus *E. coli* MRE600, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und zur Aufbewahrung bei – 70°C eingefroren.

Zur Extraktion der RNA aus Zellpellets wurden die pelletierten Zellen in 350 μ l RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol aufgenommen und zur Homogenisierung über eine „QIAshredder column“ gegeben. Das Lysat wurde mit 350 μ l 70 % Ethanol versetzt in eine „QIASpin column“ überführt. Die weitere Aufreinigung erfolgte wie im „RNA clean-up“-Protokoll beschrieben.

2.2.6 RT-PCR: Synthese von cDNA aus RNA

Bei der cDNA-Synthese wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase „Superscript“ (RNA-abhängige DNA-Polymerase, Gibco/BRL, USA) eine RNA-Sequenz in die komplementäre Einzelstrang-cDNA umgeschrieben.

Tab. 11: Ansatz zur cDNA-Synthese

	Konzentration final
5×RT-Puffer	1 ×
DTT (100 mM)	10 mM
dNTP (25 mM)	10 mM
OligodT-Primer (500 ng/μl)	750 ng
Reverse Transkriptase (RT)	300 Units
H ₂ O	ad 30 μl

Als Primer wurde ein OligodT-Primer verwendet, welcher komplementär zum OligoA-Schwanz der RNA ist. Die Synthese wurde nach dem Protokoll des RT-Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden 15 μl der extrahierten RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Tab. 12: Zyklusbedingungen RT-PCR

1 ×	Denaturierung	5 Minuten	65°C
1 ×	Synthese	52 Minuten	37°C
1 ×	Inaktivierung der RT	15 Minuten	72°C

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –70°C aufbewahrt.

2.2.7 DNA-Extraktion

Zur Bestimmung der Menge an proviraler DNA in den Zellpellets aus den Transzytoseversuchen wurde mit Hilfe des „QIAamp® DNA Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden extrahiert. Die DNA-Extraktion wurde nach Resuspendieren der pelletierten Zellen in 200 μl PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen) nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Nach Elution der DNA in 100 μl AE-Puffer wurde die Konzentration im Photometer bestimmt.

2.2.8 Quantitative Real-time PCR (TaqMan™)

Über die quantitative Real-time PCR ist es möglich, die initiale Kopienzahl des Templates durch eine Analyse des von Zyklus zu Zyklus zunehmenden Fluoreszenzsignals, welches ein Resultat der Amplifikation des Templates während der PCR-Zyklen darstellt, zu ermitteln. Hierzu wird eine spezielle, fluorogene Sonde verwendet, die aus einem der Zielsequenz komplementären Oligonukleotid – lokalisiert zwischen den beiden Primern – mit einem fluoreszenten 5'-Reporterfarbstoff (FAM: 6'-Carboxy-Fluoreszein) und einem 3'-

Quencherfarbstoff (TAMRA: 6'-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine) besteht. Zusätzlich ist das 3'-Ende der Sonde durch einen Phosphatrest blockiert, damit die Sonde nicht als Primer fungieren kann. Durch Anregung dieser Sonde durch Licht der Wellenlänge 488 nm wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der Amplifikation bindet die Sonde zunächst spezifisch an die Zielsequenz des Amplikons, wird aber in der Elongationsphase von der Taq-Polymerase verdrängt. Hierbei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, die die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert. Die Sonde wird geschnitten, die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher aufgehoben und die Emission des Reporters kann gemessen werden. Die Emission des Reporters steigt entsprechend der Zunahme des PCR-Produkts an, da für jedes synthetisierte Molekül ein spezifisches Signal erzeugt wird.

Die PCR wurde mit dem ABI PRISM™-7700-Sequence Detector (TaqMan™, ABI, Weiterstadt) quantitativ und in Echtzeit durchgeführt. Die Real-time PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt: 1. Schritt: Uracil-N-Glykosylase (UNG)-Behandlung zur Beseitigung von potentiell vorhandenen Kontaminationen durch PCR-Produkte, Schritt 2: Aktivierung der Taq-Polymerase und Inaktivierung der UNG und Schritt 3: 45 Zyklen bestehend aus der Denaturierung und Annealing bzw. Elongation.

Es wurden zwei unterschiedliche TaqMan™-PCR-Systeme zur Bestimmung der transportierten HIV-Partikel eingesetzt. Die HIV-1 Gruppe M *env*-PCR zur Detektion von HIV-1 Gruppe M und die HIV-1 Gruppe O *env*-PCR zur Detektion von HIV-1 Gruppe O. In den nachfolgenden Tabellen sind die jeweiligen Primer- und Sondensequenzen, die PCR-Ansätze und die PCR-Bedingungen aufgeführt.

Tab. 13: Verwendete Primer und Sonde für HIV-1 Gruppe M *env*-TaqMan™-PCR.

Primer/ Sonde	Sequenz
<i>env</i> sense SK 68i	5'-TTC TTX GGA GCA GCX GGA AGC ACX ATG G-3'
<i>env</i> reverse SK 69i	5'-TTM ATG CCC CAG ACX GTX AGT TXC AAC A-3'
<i>env</i> -Sonde	5'-FAM-TGA CGC TGA CGG TAC AGG CCA GAC A-TAMRA-3'

(metabion GmbH, Martinsried), X = Inosin, 5'-Reporterfarbstoff: FAM 6'-Carboxy-Fluoreszein, 3'-Quencherfarbstoff: TAMRA 6'-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine

Tab. 14: Verwendete Primer und Sonde für HIV-1 Gruppe O *env*-TaqMan™-PCR.

Primer/ Sonde	Sequenz
HIV1-O-7825F	5`-AAG AGC AGT AGG ATT GGG AAT GC-3`
HIV1-O-7954R	5`-GTC CTG CTG TTG CAC TAT ACC C-3`
HIV1-O-7876Probe	5`-FAM-TTG CCG CTG CGC CCA TAG TGC XT A-TAMRA-3`

(TibMolBiol, Berlin), X = Modif., 5`-Reporterfarbstoff: FAM 6`-Carboxy-Fluoreszein, 3`-Quencherfarbstoff: TAMRA 6`-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine

Tab. 15: *env*-TaqMan™-PCR-Ansatz.

	Konzentration final
cDNA	5,0 – 20,0 µl
Rox-Puffer 10 ×	1 ×
dN _U TP ¹	200 µM
MgCl ₂	3,5 mM
sense Primer	0,25 µM
reverse Primer	0,25 µM
Sonde	100 nM
UNG ²	0,5 Units
Taq-DNA-Polymerase	1,25 Units
H ₂ O	ad 50 µl

¹ dN_UTP: Desoxynukleosidtriphosphate mit Uridin (dUTP) statt Thymidin (dTTP) zur Präventionstechnik mit

²Uracil-N-Glykosylase (UNG), welche im ersten Schritt der Real-time PCR Uracil aus Uracil-haltiger DNA freisetzt und somit Kontaminationen mit PCR-Produkten beseitigt.

Tab. 16: *env*-TaqMan™-PCR-Bedingungen

1 ×	Hydrolyse (UNG)	5 Minuten	50°C
1 ×	Inaktivierung UNG/Denaturierung Probe	7 Minuten	94°C
45 ×	Denaturierung	30 Sekunden	94°C
	Hybridisierung und Elongation	1 Minute	62°C

2.2.9 Standards für TaqMan™-PCR

Für die Etablierung der quantitativen TaqMan™-PCR-Systeme und zur Quantifizierung der Proben über eine Standardkurve wurden für beide PCR-Systeme Standards hergestellt:

HIV-1 Gruppe M *env*-PCR-Standards

Als Standard wurde eine gereinigte Präparation des Plasmids pBT1/BS eingesetzt. Das Plasmid enthält die genomische Information von HIV-1 LAI mit Deletionen in der LTR. Zur

Quantifizierung der Proben wurde eine serielle 1:10-Verdünnung hergestellt und in die TaqMan™-PCR eingesetzt. Über eine Standardkurve konnte die Kopienzahl in der unbekannten Probe bestimmt werden.

HIV-1 Gruppe O *env*-PCR-Standards

Zur Etablierung der HIV-1 Gruppe O *env*-PCR und zur späteren Quantifizierung der Proben wurden Standards kloniert. Hierfür wurde eine präparative PCR mit den Primern der HIV-1 Gruppe O *env*-TaqMan™-PCR (HIV1-O-7825F und HIV1-O-7954R) angesetzt (Tabelle 17 und 18).

Tab. 17: präparative PCR-Bedingungen

1 ×	Denaturierung	2 Minuten	94°C
30 ×	Denaturierung	1 Minuten	94°C
	Hybridisierung und Synthese	2,5 Minuten	55°C
1 ×	Abschluss der Synthese	10 Minuten	65°C

Tab. 18: präparative PCR-Ansatz

	Konzentration final
cDNA	5,0 µl
Puffer III 10 ×	1×
5 × Optimizer	1×
dNTPs	200 µM
MgCl ₂	3,5 mM
HIV1-O-7825F	0,25 µM
HIV1-O-7954F	0,25 µM
Combi Pol™	2,0 Units
H ₂ O	ad 50 µl

Als Template diente cDNA aus einer RNA-Extraktion eines HIV-1 Gruppe O-Virusstocks. Die aufgereinigten Fragmente dieser präparativen PCR wurden in den pCR®II-TOPO-Cloning-Vektor des „TOPO TA Cloning Kits“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Angabe des Herstellers kloniert. Nach der Transformation in *Z*-kompetente *E. coli* wurden Über-Nacht-Kulturen der Kolonie, die das Plasmid mit dem korrekten Insert trägt, hergestellt und die Plasmide anschließend aufgereinigt. Nach Bestimmung der Plasmid-Konzentration im Photometer wurden die Plasmide seriell 1:10 verdünnt und in die TaqMan™-PCR eingesetzt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden je nach benötigter Zellzahl in 25 cm²- oder 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, in feuchter Atmosphäre bei 5% CO₂-Begasung kultiviert. Die adhärenenten Zellen (FL, CACO-2, 293, Hela, HepG2) wurden in D-MEM mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum FKS und je nach Zelllinie zusätzlich mit 2 mM Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 1% Natrium-Pyruvat kultiviert. Die Zellen wurden ein bis zweimal die Woche nach lösen der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung 1:5 bis 1:10 umgesetzt. Die Suspensionszellen (Molt 4/8 und CEM×174) wurden in RPMI 1640 komplettiert mit 10% FKS und 2 mM Glutamin kultiviert. Hier wurden die Zellen alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 umgesetzt. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen vor der Aussaat in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

2.3.2 Virusanzucht

Die Anzucht von HIV-1_{IIIB} erfolgte auf CEM×174-Zellen und die Anzucht von HIV-1 Gruppe O auf Molt 4/8-Zellen. Ansonsten wurde bei beiden Viren nach dem gleichen Protokoll gearbeitet. 2×10⁴ Zellen/ml wurden mit einer MOI (multiple of infection) von 10⁻³ mit den jeweiligen Viren infiziert. Die Zellen wurden solange weiter kultiviert bis ein deutlicher virusspezifischer cytopathischer Effekt (CPE) zu sehen war. Die Zellen wurden daraufhin ausgedünnt und mit einer geeigneten Menge an nicht infizierten Zellen versetzt. Das Verhältnis infizierte zu nicht-infizierten Zellen sollte bei ca. 1:5 liegen. Betrug die Anzahl der Synzythien ca. 60 bis 80 % der gesamten Kultur, wurden die Viren geerntet. Die gesamte Kultur wurde dafür für 15 Minuten bei 4°C und einer Umdrehung von 700×g zentrifugiert. Der virushaltige und zellfreie Überstand wurde aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

2.3.3 Durchführung der Transzytoseversuche

Die Transzytoseversuche wurden mit dem in Abbildung 7 gezeigtem Zwei-Kompartiment-System durchgeführt.

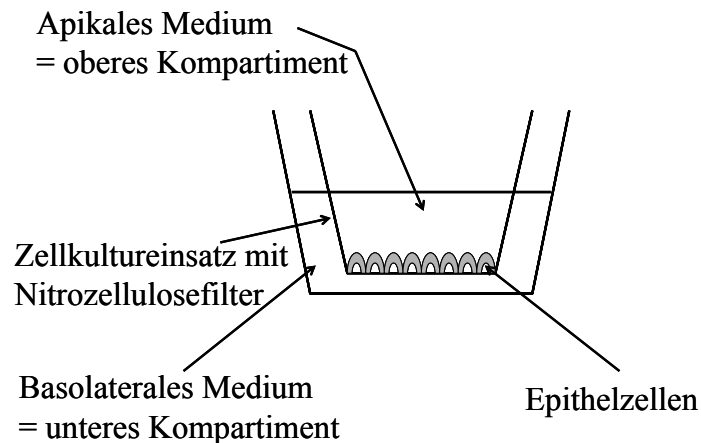


Abb. 7: Zwei-Kompartiment-System zur Untersuchung der Transzytose mit Unterteilung des Versuchsaufbaus durch den Zellkultureinsatz in ein oberes und unteres Kompartiment.

Zur Durchführung der Transzytoseversuche wurden epitheliale Zellen auf Falcon Nitrocellulosefiltern (0,3 µm Porendurchmesser, BD Falcon™, USA) bis zur vollständigen Konfluenz angezüchtet. Als epitheliale Zellen wurden in den Versuchen FL - (humane Amnionzellen, 1 bis 2×10^4 Zellen/Filter) oder CaCo-2- (Zellen eines humanen Colonadenokarzinoms, 10^5 Zellen/Filter) Zellen verwendet. Zur Etablierung eines Monolayers wurden die Zellen in D-MEM supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) über sieben Tage kultiviert.

Die Zellen wurden zur Entfernung des FKS zweimal mit PBS gewaschen. Ins untere Kompartiment wurden 800 µl D-MEM, ins obere Kompartiment 300 µl D-MEM, das zellfreie HIV-1 Gruppe O- bzw. HIV-1_{IIIB}-Viren enthielt, gegeben. Nach Zugabe der Viren wurde das System bei 37°C und 5% CO₂ über 120 bzw. 240 Minuten inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurde jeweils das Medium aus dem unteren Kompartiment entfernt und der Virustiter über Endstufentitration (siehe 2.3.6) auf Molt 4/8 - bzw. CEM×174 – Zellen bestimmt sowie die Anzahl der transportierten Partikel über RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und anschließender quantitativen Real-Time TaqMan™-PCR ermittelt (Abb. 8).

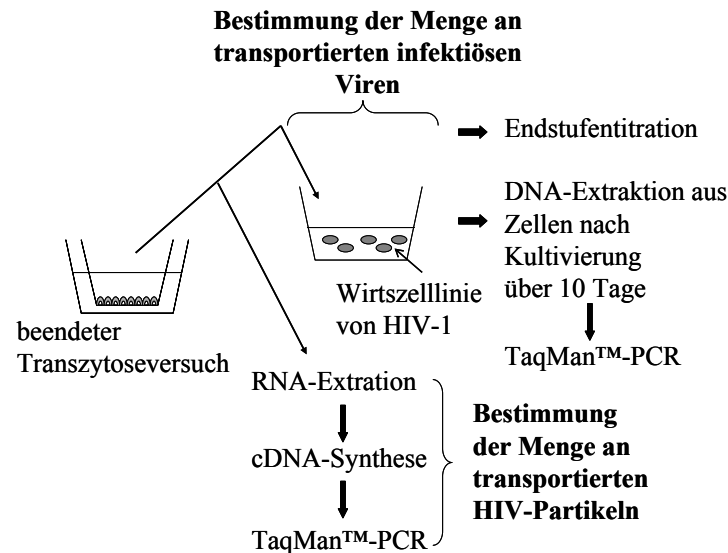


Abb. 8: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Messmethoden zur Ermittlung der Menge an transportierten Viren

Daneben wurde der Virustiter bzw. die Partikelanzahl im oberen Kompartiment vor Versuchsbeginn und nach Beendigung der Transzytose mit den genannten Methoden bestimmt. Neben der Bestimmung der Infektiösität im unteren Kompartiment über Endstufentitration wurde die Infektiösität ebenfalls mit Hilfe der TaqMan™-PCR bestimmt. Hierzu wurden 10^5 CEM×174-Zellen in 5 ml Kulturmedium mit 200 µl Medium aus dem unteren Kompartiment infiziert. Die Ansätze wurden über 10 Tage kultiviert und dann ein Zellpellet aus 1500 µl Zellsuspension bei -20°C zur DNA-Extraktion eingefroren. Der Versuchsaufbau der Transcytose wurde den unterschiedlichen Versuchen angepasst und in den jeweiligen Abschnitten im Ergebnisteil beschrieben. Die Dichtigkeit der mit FL-Zellen bewachsenen Filter wurde nach Beendigung des jeweiligen Versuchs in jedem Ansatz mit einer Kristallviolett-Lösung (CV) bestimmt [Rokos *et al.* 1998].

2.3.4 Gewinnung und Präparation von menschlicher Eihaut

Um die Ergebnisse der Transzytoseversuche mit FL-Zellen auf komplexe Gewebe übertragen zu können, wurde ein Teil der Versuche in einem Eihautmodell [Rokos *et al.* 1998] durchgeführt. Das Eihautmodell stellt unter Laborbedingungen die beste Möglichkeit dar, den Virusübertritt von der Mutter auf das Kind zu untersuchen. Die in den Versuchen verwendete Eihaut wurde von der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, Humboldt Universität in Zusammenarbeit mit PD Dr. Axel Schäfer bezogen. Es wurden sowohl Eihäute von Spontangeburt als auch von primären Kaiserschnitten (vor Einsetzen der ersten Wehen) verwendet. Die frische Eihaut wurde von der Plazenta abgeschnitten und dreimal in sterilem

PBS gespült. Zur Verarbeitung wurde die Eihaut nach Reinigung und Entfernen der Blutreste in RPMI 1640-Medium mit Nystatin und Antibiotika überführt. Nach der Überprüfung, ob beide Schichten der Eihaut noch intakt und zusammen waren, wurden 5cm×5cm große Stücke ausgeschnitten und mit der fetalen Seite nach oben über einen Plastikring gestülpt. Die Befestigung der Eihaut erfolgte mit einem Handschuhring (1cm breiter Streifen vom kleinen Finger eines sterilen Handschuhs) und Titanligaturclips. Die so präparierten Eihäute wurden auf eine Zellkulturmembran in einer 6-Lochplatte gesetzt (siehe Abb. 9) und die Transzytoseversuche wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben durchgeführt.

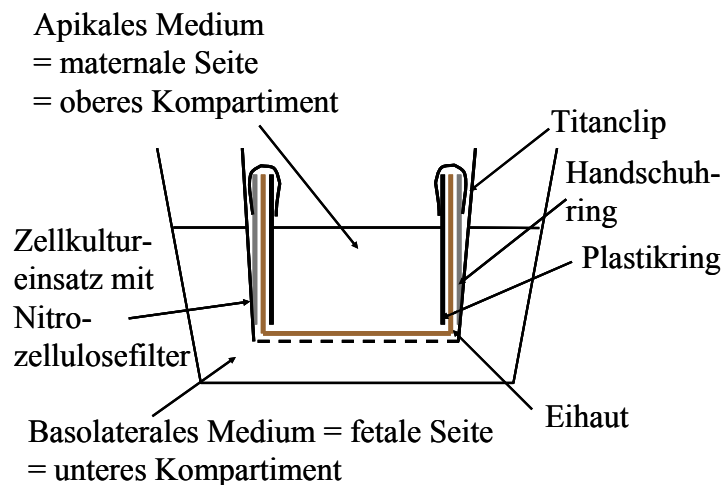


Abb. 9: Schematische Darstellung des Eihautmodells

Dabei wurde ins untere Kompartiment des Eihautmodells 3 ml Medium und ins obere Kompartiment 1 ml Virussuspension gegeben. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde 1 ml Medium aus dem unteren Kompartiment entnommen und 1 ml frisches Medium hinzugefügt, nach 20 bzw. 24 Stunden wurde die Transzytose beendet und das gesamte Medium aus dem unteren Kompartiment entnommen. In dem nach 3 und 20 bzw. 24 Stunden entnommenem Medium wurde wie bereits oben beschrieben die Menge an transportierten Viren bestimmt. Anschließend wurde die Dichtigkeit der Eihaut mit Kristallviolett ermittelt [Rokos *et al.* 1998].

2.3.5 CV-Test: Testung auf Dichtigkeit der FL-Filter

Zur Überprüfung der Dichtigkeit der Filter wurden in Anlehnung an Rokos *et al.* [Rokos *et al.* 1998] 50 µl einer Kristallviolett-Lösung (0,02 % Kristallviolett (CV), 0,2 % Formaldehyd, 1,5 % Ethanol in PBS) ins obere Kompartiment bei FL-Filtern und 1 ml beim Eihautmodell gegeben. Im unteren Kompartiment befanden sich 200 µl bzw. 2 ml PBS mit 1 % FKS. Die

Filter wurden für 120 bzw. 240 Minuten bei 4°C inkubiert, danach die Zellen oder die Eihaut im Lichtmikroskop auf undichte Stellen hin untersucht. Das PBS aus dem unteren Kompartiment wurde entnommen und im Fotometer bei der Messwellenlänge von 620 nm und Referenzwellenlänge von 450 nm auf Vorhandensein von CV untersucht. Gemessen wurde die Differenz von PBS und der Lösung im unteren Kompartiment. Konnte eine Zunahme in der Extinktion festgestellt werden, war der untersuchte Filter undicht und wurde aus der Auswertung genommen.

2.3.6 Bestimmung des Virustiters über Endstufentitration

Zur Bestimmung des Virustiters der Ausgangsvirussuspension bzw. des Mediums im unteren Kompartiment wurde je ein Aliquot sofort 1:10, 1:5 bzw. 1:3 mit Kulturmedium verdünnt, diese wurden dann seriell 1:3 oder 1:5 weiterverdünnt. Danach wurde je Verdünnungsstufe 200 µl in zwei Vertiefungen einer 24-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte überführt. Zur Optimierung der Nachweisgrenze wurden jeweils 200 µl des Mediums aus dem unteren Kompartiment unverdünnt in eine Vertiefung der 24-Loch-Platte gegeben. Zuvor waren die Löcher dieser Mikrotiterplatte mit 800 µl einer Wirtszellsuspension mit 2×10^4 Zellen/ml beschickt worden. Als Wirtszellen wurden Molt 4/8 oder CEM×174 verwendet. Nach Ausbringen der Verdünnungen auf die Mikrotiterplatte wurden diese 16 bis 18 Tage mit mehrmaligem Ausdünnen der Zellen bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen im Lichtmikroskop auf einen cytopathischen Effekt (CPE) hin untersucht, jede Kultur mit einem Anzeichen eines HIV-charakteristischen CPEs wurde als positiv gewertet. Die Berechnung des Virustiters als TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose, 50% infizierte Gewebekultur) wurde nach der Vorschrift von Kaerber und Reed & Muench [Reed & Muench 1938, Kaerber 1931] durchgeführt und auf 1 ml des Versuchsansatzes bezogen.

D = Basis der Verdünnungsreihe

D₀ = erster Verdünnungsschritt

$$\text{TCID}_{50}/\text{ml} = D^{(n/p + 0,5)} / D_0 \times D \times V$$

p = Anzahl der Parallelbestimmungen

V = eingesetztes Volumen an Virussuspension

n = Anzahl der positiven Proben

2.3.7 Aufnahme und Abgabe von HIV-1

Zur Untersuchung der Aufnahme und der Abgabe von HIV-1_{IIIB} von FL-Zellen wurden 2×10^5 Zellen/Vertiefung einer 6-Loch-Platte oder 5×10^4 Zellen/Vertiefung einer 12-Loch-Platte

eingesät und über 3 bis 4 Tage kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen zur Entfernung des FKS zweimal mit PBS gewaschen und die Viruslösung (1:10 verdünnter Virusstock in D-MEM) dazugegeben. Die Zellen wurden daraufhin für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Aufnahme der Viren in die Zelle zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurde die Viruslösung abgenommen, die Zellen dreimal mit Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen und für 10 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Proteasebehandlung sollte dazu dienen, an der Oberfläche haftenden Virus freizusetzen und zu inaktivieren (Verdau der Oberflächenproteine des Virus). Nach der Trypsinierung der Zellen wurden sie in 1 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium aufgenommen. Ein Aliquot von 500 µl wurde für die RNA-Extraktion zur Bestimmung der Menge an aufgenommenen Viren nach Pelletieren der Zellen bei -70°C eingefroren. Die restlichen Zellen wurden in eine Vertiefung einer neuen 12-Loch-Platte ausgesät und über 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zellfreier Überstand für die RNA-Extraktion zur Bestimmung der abgegebenen Virusmenge abgenommen. Gleichzeitig wurde mit 200 µl zellfreien Überstand 10⁵ CEM×174-Zellen infiziert. Diese wurden über 10 Tage kultiviert, die Zellen (1,5 ml) geerntet und die DNA extrahiert. Zur Bestimmung der Ausgangsvirusmenge wurde die eingesetzte Viruslösung auf CEM×174-Zellen austitriert.

2.3.8 Synzythien-Inhibierungsassay (SIA)

Zur Bestimmung der minimalen Wirkkonzentration der neutralisierenden Antikörper 2F5 und 2G12 bzw. zur Untersuchung der eingesetzten HIV-1 positiven Seren auf Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern wurde ein Synzythien-Inhibierungsassay (SIA) durchgeführt [Purtscher *et al.* 1996]. Hierzu wurden die monoklonalen Antikörper in unterschiedlichen Konzentration bzw. 30 µl der jeweiligen Seren mit 10² bis 10³ HI-Viren (HIV-1_{IIIB} und HIV-1 Gruppe O) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Virusmenge im Ansatz wurde über eine Endstufentitration bestimmt. Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 2 × 10⁴ CEM×174-Zellen/ml zugegeben und die Ansätze über mehrere Tage bei 37°C kultiviert. Wenn in der parallel dazu angesetzten Kontrolle ohne Serum bzw. ohne monoklonale Antikörper der erste cytopathische Effekt (CPE) beobachtet werden konnte, wurde der Versuch ausgewertet. War in den Versuchsansätzen kein CPE zu beobachten, so wurde hier eine Infektion der Zielzelle durch Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern verhindert.

2.3.9 Deglykosylierung der humanen, monoklonalen Antikörper 2F5 und 2G12

Zur Untersuchung des Einflusses der Glykoanteile der verwendeten Antikörper auf den Transport von HIV-1_{IIIB} durch epitheliale Zellen wurde durch Inkubation der Antikörper mit N-Glykosidase F (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) die Zuckerreste abgespalten. Durch eine anschließende Dialyse gegen PBS wurden die Zuckerreste und das Enzym aus der Antikörperlösung entfernt. Die Immunglobuline der Klasse G tragen an der Amid-Gruppe eines Asparaginrestes im F_c-Teil des Proteins ein N-glykosidisch gebundenes Oligosaccharid. Im Falle von IgG besteht das Oligosaccharid aus vier N-Acetylglucosamin-, drei Mannose-Resten, ein Fucose sowie ein Galactose-Rest. Das verwendete Enzym N-Glykosidase F spaltet alle Typen Asparagin-gebundener N-Glykanketten. Zur Deglykosylierung wurde eine antikörperhaltige PBS-Lösung (pH 7,2, 100 µg Antikörper) mit 10 µl des Enzyms versetzt (10 Einheiten Enzym) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden Kontrollen aus Antikörpern ohne Enzym ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Deglykosylierung wurden die Antikörper der Ansätze mit Enzym und der Kontrollansätze in einer Dialyse über 24 Stunden gegen PBS aufgereinigt. Nach abgeschlossener Dialyse wurde mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.13) mit anschließender Coomassie Brilliant Blue-Färbung die erfolgte Deglykosylierung der Antikörper überprüft. Die deglykosylierten Antikörper müssen im Gel aufgrund der geringeren Größe weiter wandern als die glykosylierten Antikörper. Nach Überprüfung wurden die aufgereinigten Antikörper in die Transzytoseversuche eingesetzt.

2.3.10 Einfluss von Env362-420 auf Infektiösität

Geeignete Peptide, die sich von der gp120-Sequenz ableiten, können durch Anlagerung an CD4 auf den Zielzellen von HIV-1 einen Einfluss auf die Infektiösität besitzen. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurde das Peptid Env362-420 (100 µM) mit 10⁵ CEM×174-Zellen/ml in serumfreiem RPMI 1640 für 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde Virus dazugegeben und weiter für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine Infektion der CEM×174-Zellen zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurden die nicht gebundenen Viren durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit RPMI 1640 entfernt. Die Zellen wurden anschließend auf frische CEM×174-Zellen titriert (1:100, 1:5 ff), so dass am Ende 2×10⁴ Zellen/Ansatz erreicht wurde. Die Ansätze wurden für mehrere Tage bei 37°C kultiviert, bis in den Kontrollansätzen ohne Peptide keine Veränderung in der Ausbildung eines CPE in den

Verdünnungsstufen mehr beobachtet werden konnte. Die Versuche mit den Peptiden wurden mit den Kontrollversuchen verglichen und eine Aussage über den Einfluss auf die Infektiösität getroffen.

2.3.11 Nachweis der Bindung von Env362-420mod. an epitheliale Zellen

Die Bindung von Env362-420mod. wurde an folgenden epithelialen Zelllinien untersucht: FL-, CaCo-2-, HT29/B6 (Colorektales Adenokarzinom)- und Hela (Cervixkarzinom)-Zellen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 1 bis 4×10^4 Zellen/Kammer auf Kammer-Objektträgern (BD Falcon™, USA) angezüchtet. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nach Abnahme des Überstandes zweimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von FKS-freiem Medium auf 12°C pre-equilibriert. Nach der Pre-Equilibrierung wurde Env362-420mod., gelöst in Kulturmedium (Konzentration $100 \mu\text{M}$), zu den Zellen gegeben, auf die Kontrollzellen D-MEM mit der entsprechenden Menge an DMSO. Die erste Inkubation zur optimalen Bindung des Peptids an die Zelloberfläche wurde für 30 Minuten bei 12°C durchgeführt. Zur Reorganisation der Plasmamembranen der Zellen sowie zur Stabilisierung der Bindung wurden die Zellen anschließend für 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zu 4°C transferiert und nicht gebundene Peptide durch dreimaliges Waschen von je 15 Minuten mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit einer 4%igen Formalinlösung fixiert, zur Entfernung des Formalins mit PBS gewaschen und 15 Minuten mit Lysin-Puffer (10 mM Lysin in PBS) zur Blockierung freier Aldehydgruppen inkubiert. Nach der Blockierung wurde Kaninchenserum (Immunserum von Tier 1, siehe 2.5.1) 1:100 verdünnt in Lysin-Puffer auf die Zellen gebracht und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (anti-Kaninchen-FITC-Antikörper 1:20 verdünnt in PBS mit 10 mM Lysin) für 90 Minuten bei 37°C . Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, getrocknet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Filter 480 – 510 nm). Hier wurde die Fluoreszenz durch Bindung von Env362-420mod. an die Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO beurteilt. Die Durchführung dieser Methode erfolgte in Anlehnung an Alfsen *et al.* [Alfsen *et al.* 2001].

2.3.12 Alkalische-Phosphatase-anti alkalische-Phosphatase Technik (APAAP)

Zum Nachweis einer Expression von gp120 in den Säugetierzellen wurden 24 und 48 Stunden nach der Transfektion von abgeschabten Zellen Zytofugenpräparate angelegt. Als Kontrolle dienten die Zellen der Transfektion mit pBSSK+. Die Zytofugenpräparate wurden in 4%

Formalin fixiert und in PBS“ohne“ bei 4°C aufbewahrt. Die APAAP-Technik zum Nachweis von gp120 mit spezifischen Antikörpern (2G12) wurde nach einer auf dem Protokoll von Cordell [Cordell *et al.* 1984] basierenden von der Arbeitsgruppe modifizierten Vorschrift durchgeführt [Niedrig *et al.* 1993]. Um die Zellwand der formalinfixierten Zellen permeabel für die Antikörper zu machen, wurden die Präparate vor der APAAP-Reaktion mit 1% Triton X100 behandelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop, als positive Kontrolle dienten Zytofugenpräparate mit HIV-1 infizierten CEM×174-Zellen.

2.4 Serologische Methoden

2.4.1 Peptid-ELISA

Testprinzip

Im ersten Schritt wird das Antigen (Ag), in diesem Falle das synthetisierte Peptid, an einen nicht löslichen Träger (Maxisorb[®] Immunoplate von Nunc GmbH und Co KG, Wiesbaden) gebunden. Während dieser Inkubation nicht-gebundenes Ag wird nach der Beschichtungszeit abgewaschen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen werden die Vertiefungen der Immunoplate anschließend mit einer proteinhaltigen Pufferlösung wie z.B. 10% neonatales Kälberserum (NKS) in PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen können die zu untersuchenden Seren einpipetiert werden. In einer definierten Inkubationsdauer binden die gegen das Ag gerichteten spezifischen Antikörper an das Ag. Während des folgenden Waschvorgangs werden nicht gebundene Antikörper wieder entfernt. Im nächsten Schritt werden die Platten mit einem Enzym-konjugierten gegen humane Antikörper gerichteten Antikörper inkubiert. Nach dieser Inkubation wird überschüssiges Konjugat entfernt und die Substratlösung dazugegeben. Das Substrat wird in Anwesenheit des gekoppelten Enzyms in ein farbiges Endprodukt umgesetzt, diese Umsetzung kann nach Zusetzung der Stopp-Lösung im Photometer bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden. Die gemessene Extinktion ist ein Maß für die Menge an spezifischen Antikörpern im untersuchten Serum.

Beschichtung der Platten

Die Platten wurden mit einer Peptid-haltigen Carbonatpufferlösung beschichtet. Hierzu wurde eine definierte Menge Peptid (siehe Optimierung der Versuchsbedingungen) in Carbonatpuffer (100 mM, pH 9,6) gelöst, in die Vertiefungen der zu beschichteten Platte pipetiert und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der

Beschichtung wurde überschüssiger Peptid-Puffer durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt.

Blockierung der nicht-abgesättigten Bindungsstellen

Freie Bindungsstellen der verwendeten Immunoplaten nach Beschichtung müssen zur Reduzierung der unspezifischen Reaktionen blockiert werden. Dazu wurde in die Vertiefungen der Immunoplatte eine proteinhaltige PBS-Lösung (siehe Optimierung der Versuchsbedingungen) pipetiert und für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die proteinhaltige PBS-Lösung durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer wieder entfernt. Die Platten wurden entweder nach Trocknung bei -20 °C aufbewahrt oder direkt in den ELISA eingesetzt.

Durchführung des Peptid-ELISAs

Der ELISA wurde in Anlehnung an das Protokoll des Murex HTLV I + II-ELISAs von Abbott -teilweise mit den mitgelieferten Reagenzien- durchgeführt. Die HIV-positiven und HIV-negativen Seren wurden in Probenverdünner (Murex HTLV I + II-ELISA) verdünnt und 100 µl der Serumverdünnung in die jeweiligen Vertiefungen einer mit Peptid beschichteten Platte pipetiert. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer in der feuchten Kammer wurden die Seren nach fünfmaligen Waschen mit Waschpuffer (Murex HTLV I + II-ELISA) wieder entfernt. Der mit Peroxidase konjugierte Anti-human IgG Antikörper von der Ziege (Peroxidase conjugate-goat anti-human IgG gamma chain specific affinity isolated antibody, Sigma-Aldrich USA, zweiter Antikörper) wurde in Probenverdünner verdünnt und je 50 µl der Konjugatlösung in die jeweiligen Vertiefungen gegeben. Nach der 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde mit fünf Waschschritten der zweite Antikörper wieder entfernt. Im Anschluss daran wurde 100 µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, Murex HTLV I + II-ELISA) zugegeben und wieder für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zufügen von 50 µl einer Stopplösung (0,5 N Schwefelsäure, Murex HTLV I + II-ELISA) wurden die jeweiligen Extinktionen bei 450 nm mit 620 nm als Referenzwellenlänge gegen Luft gemessen. Die Mittelwerte der Extinktionen der HIV-1 negativen Seren wurden von den Werten der HIV-1 positiven Seren abgezogen. Seren die nach Abzug der Mittelwert von über 0,1 lagen, wurden als positiv bewertet.

Optimierung der Versuchsbedingungen

Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden ELISAs mit aus der Serumbank ausgesuchten HIV-1 positiven und negativen Seren angesetzt. Es wurden folgende Versuchsparameter optimiert: Serumverdünnung, die Verdünnung des zweiten Antikörpers, Peptidkonzentration zur Beschichtung, Blockierungsreagenz, Temperatur und Dauer der Seruminkubation und Zusammensetzung des Probenverdünners und Waschpuffers. Die Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Optimierung. Aufgrund der hohen Extinktionswerte der HIV-negativen Seren wurde versucht, nach Optimierung des Peptid-ELISAs mit unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen im Probenverdünner und im Waschpuffer diese Werte zu senken. Die jeweiligen ELISAs zur Optimierung wurden in Anlehnung an das Murex-Protokoll durchgeführt. Bereits optimierte Parameter wurden in das Protokoll übernommen.

Tab. 19: Optimierung des Peptid-ELISAs.

Optimierte Parameter		Differenz ¹	Konstante Parameter ²
Serumverdünnung	1:20	0,669	Plattenbeschichtung 0,5µg/well,
	1:40	0,683	Konjugatverdünnung 1:5000,
	1:100	0,581	Blockierung 10% FKS
	1:200	0,625	
Konjugatverdünnung ³ (zweiter Antikörper)	1:5000	0,581	Plattenbeschichtung 0,5µg/well,
	1:10.000	0,358	Serumverdünnung 1:100,
	1:20.000	0,202	Blockierung 10% FKS
Plattenbeschichtung ⁴	0,25 µg Peptid	0,232	Serumverdünnung 1:100, Konju-
	0,5 µg Peptid	0,417	gatverdünnung 1:5000, Blockier-
	1,0 µg Peptid	0,426	ung 10% FKS, Probenverdünner
	10,0 µg Peptid	0,455	und Konjugat 10% NKS
Blockierung	10% NKS	0,417	Plattenbeschichtung 0,5µg/well,
	3% BSA	0,379	Serumverdünnung 1:100, Konju-
	5% FKS/5% NKS	0,330	gatverdünnung 1:5000, Probenver-
	10% Milchpulver	0,325	dünner und Konjugat 10% NKS

Optimierte Parameter		Differenz ¹	Konstante Parameter ²
Temperatur	37°C	0,391	siehe Blockierung, Blockierung
	Raumtemperatur	0,152	10% NKS
	4°C	0,06	
Seruminkubation	1 Stunde	0,007	Siehe Blockierung, Blockierung
	2 Stunden	0,201	10% NKS, Temperatur 37°C
	18 Stunden	0,476	
	24 Stunden	0,431	
Harnstoffkonzentration im Probenverdünner und Waschpuffer	1M	0,435	siehe Blockierung, Blockierung
	2M	0,432	10% NKS, Temperatur 37°C,
	3M	0,598	Seruminkubationsdauer 18
	4M	0,697	Stunden, Konjugat zusätzlich 1M
	5M	0,444	Harnstoff

Soweit keine weitere Angabe zu den ELISA-Bedingungen der einzelnen Optimierung gemacht wurden, wurden die Bedingungen aus dem Murex-Protokoll verwendet. ¹Differenz bedeutet Extinktion der HIV-positiven Seren abzüglich der Extinktion der HIV-negativen Seren. ²bei den Ansätzen dieser Optimierung gleich bleibende Parameter, ³Konjugat: Peroxidase conjugate-goat anti-human IgG gamma chain specific affinity isolated antibody (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) ⁴Angabe der Peptidmenge bezieht sich auf eine Vertiefung einer 96-Lochmikrotiterplatte.

Optimierte Testdurchführung

Basierend auf dem Murex-Protokoll und der oben beschriebenen Durchführung der Beschichtung und Blockierung wurde der Peptid-ELISA mit folgenden Änderungen und Zusätzen durchgeführt:

- Peptidkonzentration zur Beschichtung: 0,5 µg/Vertiefung einer 96-Lochmikrotiterplatte
- Blockierungsreagenz: 10% NKS
- Serumverdünnung: 1:100, 1:200
- Probenverdünner: 10% NKS, 4 molar Harnstoff (final)
- Temperatur der Seruminkubation: 37°C
- Dauer der Seruminkubation: 18 bis 24 Stunden
- Waschpuffer: zusätzlich 4 molar Harnstoff
- Konjugatverdünnung: 1:5000, 10% NKS, 1 molar Harnstoff

2.5 Untersuchungen an mit Env362-420 immunisierten Kaninchen

2.5.1 Immunisierung und Boostern der Kaninchen

Zur Herstellung von Immunsereen wurden zwei Kaninchen (Versuchsvorhaben: Herstellung von Ak gegen HIV-Glykoprotein gp120, Anzeigennummer H0142/03) mit einem Peptid auf Grundlage des Sequenzalignements immunisiert (s. Kapitel 3.3.8). Das Peptid wurde an das Trägerprotein KLH (*keyhole limpet haemocyanin*, Hämocytein der Schlüsselloch-Napfschnecke) gekoppelt (1mg Peptid/1mg KLH) und in PBS aufgenommen. Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut aus der Ohrvene abgenommen, über Nacht bei 4°C stehen gelassen, zentrifugiert (10 min, 700×g) und der Überstand abgenommen. Die Präseren wurden anschließend aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Zur Grundimmunisierung wurde 1ml der Peptid-KLH-Konjugat-Lösung in PBS mit 1 ml Freundesches Adjuvans komplett vermischt. Diese Mischung wurde dem jeweiligen Kaninchen in zwei Portionen subkutan als Depot injiziert. Bei der Boosterung 14 Tage nach Grundimmunisierung wurde in der gleichen Weise verfahren. Jedoch wurde hier die Peptid-KLH-Konjugat-Lösung mit inkomplettem Freundeschem Adjuvans vermischt. 10 Tage nach der Boosterung wurde den Kaninchen erneut Blut aus der Ohrvene entnommen und daraus Serum wie oben beschrieben gewonnen. Die Kaninchenseren (Präseren und Seren nach der Boosterung) wurden zur Bestimmung des Antikörpertiters in einen modifizierten Peptid-ELISA eingesetzt, zur Charakterisierung der Bindung an virales gp120 im Western Blot und im Immunfluoreszenztest untersucht und das neutralisierende Potential im Synzythien-Inhibitionsassay (SIA) bestimmt. Anschließend wurden die Seren in die Transzytoseversuche mit FL-Zellen und menschlicher Eihaut eingesetzt.

2.5.2 Charakterisierung der Immunsereen

Peptid-ELISA

Zur Bestimmung der Antikörpertiter in den Kaninchenseren vor und nach der Immunisierung wurde ein ELISA in Anlehnung an den in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Peptid-ELISA durchgeführt. Abweichend von dem Protokoll wurden die Immunoplaten mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid beschichtet und als Peroxidase-konjugierter Antikörper wurde der POD-konjugierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper von der Ziege in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Die einzelnen Seren wurden 1:1000 vorverdünnt und seriell 1:2 bis 1:1.024.000 weiterverdünnt eingesetzt. Die Extinktionen der jeweiligen

Präseren wurden von den Extinktionen der Seren nach Immunisierung abgezogen. Als Antikörpertiter wurde die letzte Verdünnung gewertet, bevor die Extinktionen unter dem Schwellenwert der Extinktion der Präseren plus 0,2 OD lag.

Synzythien-Inhibierungsassay (SIA)

Der Synzythien-Inhibierungsassay wurde wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben durchgeführt. Es wurden sowohl die Präseren als auch die Seren nach der Immunisierung 1:10 und 1:100 verdünnt in den Assay eingesetzt. Beurteilt wurde die Ausbildung von Synzythien nachdem im Kontrollansatz ohne Kaninchenserum ein CPE zu sehen war. Ansätze, die zu diesem Zeitpunkt keinen CPE zeigten, beinhalten neutralisierende Antikörper.

Western Blot

Vor Durchführung des Western Blots wurde HIV-1_{IIIB}-Überstand nach Zentrifugation (90 Minuten bei 15.800×g) und Aufnahme in Ladepuffer über eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese wie in Kapitel 2.2.1.13 beschrieben aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens auf Nitrocellulosemembran transferiert und diese in Streifen geschnitten in den Western Blot eingesetzt. Zur Überprüfung der Auftrennung und Transfer der HIV-Proteine wurden ein Western Blot nach dem Genelab[®] HIV-1 Western Blot Protokoll mit der mitgelieferten HIV-1 Positivkontrolle durchgeführt. Vor Untersuchung der Kaninchen-Seren wurden die einzelnen Streifen für 60 Minuten auf dem Schüttler zur Blockierung freier Bindungsstellen in einer 5%igen Magermilchpulverlösung in PBS (Blockierungspuffer) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T (PBS + 0,1% Tween 20) erfolgte die Seruminkubation. Hierfür wurden die Seren 1:10, 1:100, 1:200 und 1:400 verdünnt in Blockierungspuffer mit dem jeweiligen Blotstreifen für 60 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen die Konjugatinkubation. Der Peroxidase-konjugierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus der Ziege wurde 1:2500 in Blockierungspuffer verdünnt eingesetzt. Nach 60 Minuten wurden die Streifen wiederum dreimal mit PBS-T gewaschen und danach mit Substrat für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Als Substrat diente 4-Chloro-1-Naphtol mit H₂O₂ (2 ml 4-Chloro-1-Naphtol-Stock + 10 ml Triethanolamin-gepufferte Kochsalzlösung pH 7,5 + 5 µl H₂O₂). Die Reaktion konnte nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS gestoppt werden. Die Beurteilung der Banden erfolgte nach Trocknung der Streifen. Anhand des mitgeführten Größenstandards konnte die gp120-Bande identifiziert und die Blots mit Präserum bzw.

Serum nach Immunisierung auf das Vorhandensein dieser spezifischen Bande hin beurteilt werden.

Immunfluoreszenztest

Im Immunfluoreszenztest wurde die Bindung der Kaninchenserum an zellassoziertes gp120 von HIV-1_{IIIB}-infizierten Zellen untersucht. Hierzu wurden HIV-infizierte CEM×174-Zellen durch direkte Zugabe von Formaldehyd (37%) ins Medium fixiert. Die Endkonzentration betrug 4% Formaldehyd und die Inkubationszeit bei Raumtemperatur 30 Minuten. Anschließend wurden die fixierten Zellen zur Entfernung des Formaldehyds dreimal mit PBS gewaschen. Vor Inkubation mit den jeweiligen Kaninchenserum wurden die Zellen in PBS mit 10 mM Lysin aufgenommen und zur Blockierung von freien Aldehydgruppen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Seruminkubation erfolgte nach Zugabe der einzelnen Seren bzw. Serumverdünnungen für 105 Minuten bei 37°C. Hier wurden die Seren in Verdünnungen von 1:10 bis 1:200 eingesetzt. Nach der Seruminkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in der Konjugatlösung (anti-Kaninchen IgG-FITC-Antikörper 1:20 verdünnt in PBS mit 10 mM Lysin) aufgenommen. Zur Bindung der FITC-markierten Antikörper wurden die Ansätze 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden nicht-gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Mikroskopie wurden die Zellen in PBS auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Filter 480 – 510 nm) konnte Bindung der Antikörper in den Kaninchenserum an zellassoziertes gp120 durch Überprüfung der Fluoreszenz im Vergleich zwischen Präserum und Serum nach Immunisierung beurteilt werden.

3 Ergebnisse

Die Infektion des Kindes durch die Mutter während der Schwangerschaft oder der Geburt stellt ein anwachsendes Problem – insbesondere in den Entwicklungsländern - dar. Aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Probleme mit den verfügbaren Präventionsmaßnahmen werden neue, effektive Maßnahmen gegen die vertikale Transmission von HIV, die auch in den Entwicklungsländern durchgeführt werden können, gebraucht. Mit diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Übertragungsmechanismus in Hinblick auf einer möglichen Entwicklung neuer Interventionsstrategien weiter aufzuklären.

3.1 Etablierung der TaqMan™-PCR-Systeme

Zur Messung des Transportes von HIV mussten zuerst geeignete Nachweissysteme etabliert werden, mit denen eine Quantifizierung der infektiösen und der physikalischen HIV-Partikel möglich war. Für den Nachweis von Viruspartikeln wurden TaqMan™-PCR-Systeme entwickelt, die eine exakte Quantifizierung der Genomäquivalente von HIV-1 und HIV-1 Subtypen ermöglichten. Es wurden zwei unterschiedliche TaqMan™-PCR-Systeme etabliert: zur Detektion von HI-Viren der Gruppe M und zur Detektion von HI-Viren der Gruppe O. Im Methodenteil sind Primer- und SONDENSEQUENZEN sowie die Zyklerbedingungen der beiden TaqMan™-PCR-Systeme aufgeführt. Eine HIV-1 Gruppe M *env*-TaqMan™-PCR war bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Versuchsbedingungen wurden soweit übernommen, jedoch zusätzlich zur Verbesserung der Nachweisgrenze die Annealing-Temperatur optimiert. Dazu wurde die TaqMan™-PCR mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen von 55°C bis 62°C durchgeführt. Als Template wurde bei allen Optimierungsansätzen cDNA mit der gleichen Kopienzahl verwendet. Bei einer Annealing-Temperatur von 62°C wurden die niedrigsten C_T-Werte ermittelt, d.h. die höchste Sensitivität erreicht und als optimierte Annealing-Temperatur in das Protokoll übernommen. Je niedriger der C_T-Wert, desto früher findet eine messbare Amplifikation statt. Zur Optimierung der PCR-Bedingungen der HIV-1 Gruppe O *env*-TaqMan™-PCR wurden Ansätze mit unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen von 1 bis 4 mM in 0,5 mM-Schritten in die TaqMan™-PCR eingesetzt. Eine MgCl₂-Konzentration von 3,5 mM wurde als die Konzentration mit den niedrigsten C_T-Werten bestimmt. Die weitere Optimierung der Zyklerbedingungen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Auch hier konnte bei einer Annealing-Temperatur von 62°C die beste Amplifikation beobachtet werden. Ansonsten wurde die HIV-1 Gruppe O *env*-TaqMan™-PCR mit dem gleichen PCR-Ansatz

und den gleichen Zyklerbedingungen wie die HIV-1 Gruppe M *env*-TaqMan™-PCR durchgeführt. Nach der Optimierung wurden zur Quantifizierung und zur Bestimmung der Sensitivität bei beiden Systemen – wie im Methodenteil beschrieben - Standards hergestellt und in den Konzentrationen 5×10^0 bis 5×10^3 bei der HIV-1 Gruppe O *env*-TaqMan™-PCR und $1,5 \times 10^1$ bis $1,5 \times 10^4$ bei der HIV-1 Gruppe M *env*-TaqMan™-PCR eingesetzt. Die Abbildungen 10 und 11 zeigt die Standardkurven der beiden TaqMan™-PCR-Systeme.

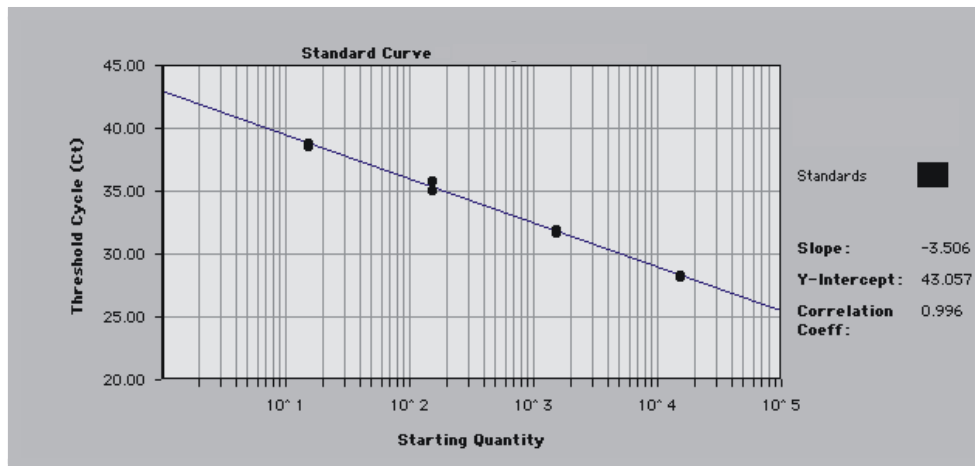


Abb. 10: Standardkurve zur HIV-1 Gruppe M-*env*-TaqMan™-PCR zur Quantifizierung von HIV-Genomen, auf der x-Achse sind die Kopienzahlen und auf der y-Achse die Anzahl der Zyklen aufgetragen, bei den angegebenen Messwerten handelt es sich jeweils um Doppelbestimmungen. Die Versuchsbedingungen sind im Kapitel 2.2.8 angegeben.

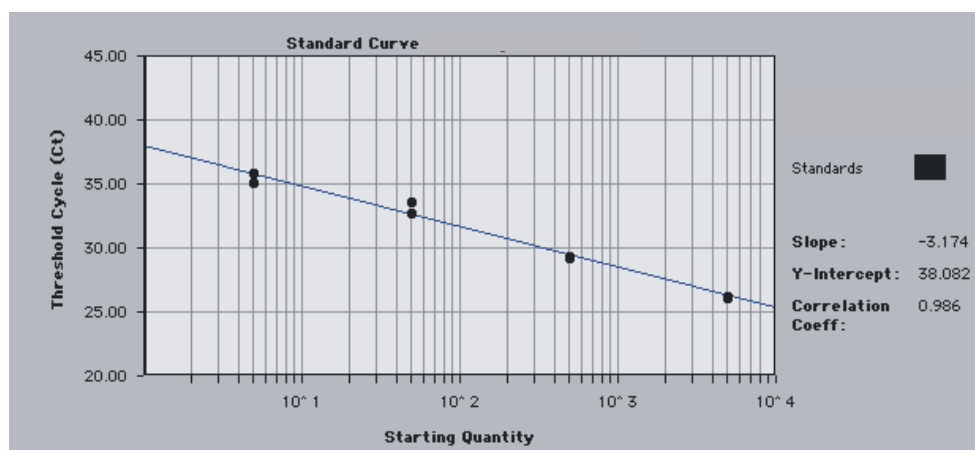


Abb. 11: Standardkurve zur HIV-1 Gruppe O-*env*-TaqMan™-PCR zur Quantifizierung von HIV-Genomen, auf der x-Achse sind die Kopienzahlen und auf der y-Achse die Anzahl der Zyklen aufgetragen, bei den angegebenen Messwerten handelt es sich jeweils um Doppelbestimmungen (siehe 2.2.8).

3.2 Etablierung des Modellsystems zur Messung des Transports von infektiösen und physikalischen HIV-Partikeln

Die bisherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden entweder in einem Modellsystem mit menschlicher Eihaut [Rokos *et al.* 1998] oder mit kultivierten primären Mundschleimhautzellen [Kage *et al.* 1998] durchgeführt. Zur Etablierung des Modellsystems mit permanenten Zellkulturen (CaCo-2 bzw. FL-Zellen) wurden zu Beginn der Arbeit Transzytosekinetiken durchgeführt. Dazu wurden die Transzytosen wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben durchgeführt. Das Medium aus dem unteren Kompartiment wurde nach je 30, 60 und 120 Minuten geerntet und durch neues Medium ersetzt. Die Ermittlung der transportierten Viren im Medium aus den unteren Kompartimenten erfolgte über die Endpunkt titration in Zellkulturen (siehe 2.3.6) und über die TaqMan-PCR nach RNA-Extraktion (siehe 2.2.5) und cDNA-Synthese (siehe 2.2.6). In Abbildung 12 sind exemplarisch für die Etablierung die Ergebnisse eines Transzytoseversuchs von HIV-1_{III}B durch FL-Zellen dargestellt. Aufgetragen ist die kumulierte Menge an transportierten infektiösen Viren (Abb. 12a) und HIV-Partikeln (Abb. 12b) zu den angegebenen Zeitpunkten.

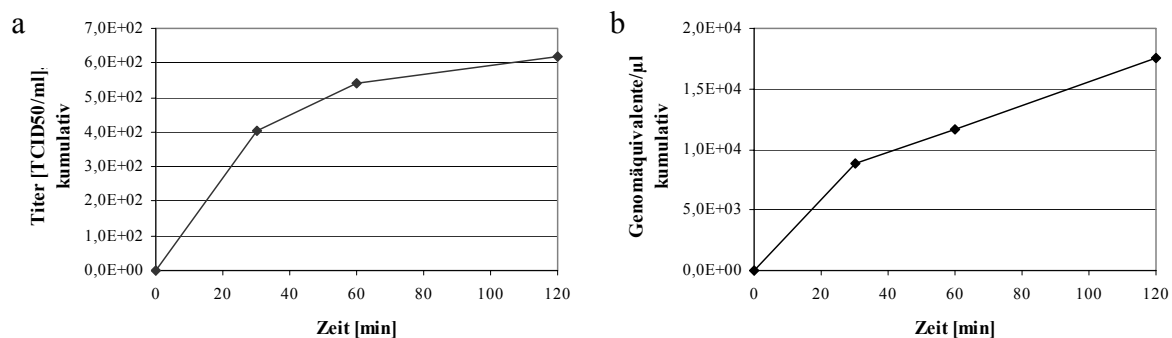


Abb. 12: Kinetik der Transzytose von HIV-1_{III}B durch FL-Zellen, Darstellung der transportierten infektiösen Viren (a: Angabe in TCID₅₀/ml) und HIV-Partikel (b: Angabe in Genomäquivalente/μl) aus dem Medium des unteren Kompartiments nach 30, 60 und 120 Minuten einer Transportkinetik. Es wurden im oberen Kompartiment $6,4 \times 10^4$ TCID₅₀/ml infektiöse Viren eingesetzt, dieser Titer entsprach $3,3 \times 10^9$ Genomäquivalente/ml. Über zwei Stunden wurden insgesamt ca. 1% an infektiösen Viren und 1,5% an HIV-Partikel transportiert.

Die Kinetik zeigt, dass schon nach 30 Minuten infektiöse Viren und HIV-Partikel im unteren Kompartiment nachzuweisen sind. Die Menge an transportierten Viren oder HIV-Partikel nimmt über die Zeit ab, das Transportsystem scheint nach dieser Zeit gesättigt zu sein. Eine Diffusion der Viren durch die Epithelzellen kann aufgrund der Sättigung weitgehend ausgeschlossen werden. Es werden in zwei Stunden ca. 1% der eingesetzten infektiösen Viren

und ein vergleichbarer Prozentsatz von ca. 1,5% der eingesetzten HIV-Partikel durch die Epithelzellen transportiert. Die Kinetiken gleichen denen, die mit menschlicher Eihaut bzw. mit primären Mundschleimhautepithelzellen ermittelt wurden.

3.3 Werden auch nicht-infektiöse Partikel von der Epithelzelle transportiert?

Bei der Etablierung des Modellsystems zeigte sich, dass 1% der eingesetzten infektiösen Viren und 1,5% der eingesetzten Viruspartikel transportiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch nicht-infektiöse Partikel, die neben den infektiösen Viren den Hauptbestandteil der Überstände von infizierten Zellen (Virusstock) darstellen, transportiert werden. Mit den folgenden Versuchen, die in Anlehnung an die Methode 2.3.7 mit infektiösen und hitzeinaktivierten Virusstocks durchgeführt wurden, sollte dieser Vermutung nachgegangen werden. Zur Herstellung des inaktivierten Virusstocks wurde ein Aliquot für 30 Minuten auf 56°C erhitzt. Die Inaktivierung der Infektiösität konnte durch eine Endstufentitration bestätigt werden, es wurde nach der Hitzebehandlung kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen. Zur Auswertung der Versuche wurde die Menge an aufgenommenen und abgegebenen Viren der Versuche mit infektiösen Viren als 100% gesetzt und mit den Werten der Versuche mit inaktivierten Viren verglichen. Bei Verwendung von infektiösen Viren konnte in den Zellen in der HIV-1 Gruppe M *env*-TaqMan™-PCR $2,8 \times 10^2$ Kopien/μl und im Überstand $1,1 \times 10^2$ Kopien/μl nachgewiesen werden. Beim inaktivierten Virusstock wurde in den Zellen nur $4,4 \times 10^1$ Kopien/μl und im Überstand nur $5,0 \times 10^0$ Kopien/μl nachgewiesen. Die Versuche zeigten, dass hitzeinaktivierte Partikel von den verwendeten Epithelzellen aufgenommen und abgegeben werden können. Jedoch ist die Menge deutlich reduziert, es werden im Vergleich zu den infektiösen Viren nur 16% der Menge aufgenommen, dementsprechend werden auch weniger Viren abgegeben (4,5% im Vergleich zu infektiösen Viren). Der Reduktion der Aufnahme und Abgabe von Viruspartikeln bei hitzeinaktivierten Viren im Vergleich zu unbehandelten Viruspräparationen steht im Gegensatz zur Beobachtung, dass ein vergleichbarer Prozentsatz an infektiösen und physikalischen Partikeln durch Zellen transportiert werden. Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass hitzebehandelte Viren zusätzlich zum spontanen Verlust von gp120 [Gelderblom *et al.* 1987 II] weitere Oberflächenproteine verlieren.

3.4 Sind die verwendeten Epithelzellen mit HIV-1 infizierbar?

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass HIV-1_{IIIB} von Epithelzellen aufgenommen werden kann. Im Rahmen der Untersuchung des Transportmechanismus sollte auch überprüft

werden, ob es bei der Aufnahme von HIV-1 in die Epithelzelle auch zu einer Infektion d.h. zu einem Umschreiben der viralen, genomischen RNA in provirale DNA und zu einer Integration dieser DNA in das Wirtszell-Genom kommt. Hierzu wurden FL-Zellen wie im Methodenteil 2.3.7 beschrieben mit HIV-1_{IIIB} inkubiert und die Zellen nach Trypsinieren und Waschen wieder ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die FL-Zellen erneut trypsiniert und anschließend die DNA extrahiert. In der HIV-1 *env*-TaqMan™-PCR wurden die Proben auf Vorhandensein von proviraler DNA untersucht, welche für eine erfolgreiche Infektion der Zelle stehen würde. In keinem der Ansätze konnte in den FL-Zellen provirale DNA nachgewiesen werden, eine Infektion der FL-Zellen durch HIV-1_{IIIB} kann somit ausgeschlossen werden.

3.5 Hemmung der Transzytose durch humane monoklonale Antikörper

Zur Untersuchung, ob humane gegen die HIV-1 Glykoproteine gp120 und gp41 gerichtete neutralisierende, monoklonale Antikörper in der Lage sind den Transport von HIV-1 durch epitheliale Zellen zu hemmen, wurden die beiden gut charakterisierten monoklonalen Antikörper 2F5IgG [Muster *et al.* 1993] und 2G12IgG [Buchacher *et al.* 1994] in die Transzytoseversuche eingesetzt. Die Antikörper wurden von Prof. Hermann Katinger, Institut für angewandte Mikrobiologie, Wien freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Beide Antikörper sind gegen nicht immundominante Epitope gerichtet. 2F5 erkennt ein Epitop bestehend aus 16 aufeinanderfolgenden Aminosäuren (NEQELLELDKWASLWN) in der Nähe des C-Terminus von gp41 [Parker *et al.* 2001]. 2G12 erkennt ein Epitop in der Nähe der C4/V4-Region von gp120. Dieses Epitop wird aus Mannose-Resten der Glykane der Aminosäuren Asparagin an der Position 295 und 332 gebildet. Für die Bindung von 2G12 an gp120 sollen neben den erwähnten Glykanen auch noch Glykane der Asparagine an den Positionen 392, 339 und 386 eine Rolle spielen [Sanders *et al.* 2002, Scalan *et al.* 2002]. 2F5 und 2G12 neutralisieren *in vitro* verschiedene T-Zell-adaptierte Viren [Purtscher *et al.* 1994] und primäre Isolate der Subtypen A, B, C and E [Xu *et al.* 2001, Mascola *et al.* 1997, Purtscher *et al.* 1996, Trkola *et al.* 1996] sowie chimäre humane-simiane Immunodefizienz Viren (SHIV) [Li *et al.* 1998, Li *et al.* 1997]. In Kombination mit weiteren monoklonalen Antikörpern und HIV-Immunglobulin als passive Immunisierung konnte *in vivo* eine Infektion von Macaquen durch eine intravenöse oder mukosale Gabe von SHIV verhindert werden [Hofmann-Lehmann *et al.* 2002, Baba *et al.* 2000, Mascola *et al.* 2000, Mascola *et al.* 1999]. Zudem gibt es in ersten klinischen Studien der Phase 1 Hinweise darauf, dass die Gabe

von 2F5 und 2G12 antivirale Effekte bei chronisch HIV-1-infizierten Patienten haben könnte [Stiegler *et al.* 2002].

3.6 Bestimmung der minimalen Wirkkonzentration

Vor der Durchführung der Transzytoseversuche wurde mittels des Synzythium-Inhibierungsassay die Wirkung der Antikörper auf die in den Transzytoseversuchen verwendeten Laborisolate von HIV-1 untersucht (siehe 2.3.8). Zur Bestimmung der minimalen Wirkkonzentration wurden die beiden monoklonalen Antikörper in verschiedenen Konzentrationen in den Synzythien-Inhibierungsassay (SIA) eingesetzt. Bei HIV-1_{IIIB} konnte für 2F5 eine minimale Wirkkonzentration zwischen 1 und 5 µg/ml und für 2G12 von etwa 5 µg/ml ermittelt werden. Diese Konzentrationen stimmen mit den Literaturangaben überein. Zur 50 %igen Neutralisierung des Isolats HIV-1_{IIIB} wird mit 2F5 1,6 µg/ml und mit 2G12 4,6 µg/ml im Synzythien-Inhibierungsassay benötigt (EC₅₀-Werte) [Trkola *et al.* 1996, Purtscher *et al.* 1994]. Weder 2F5 noch 2G12 neutralisieren wie erwartet das HIV-1 Gruppe O Virusisolat. Aufgrund dieser Befunde und der Analyse der Aminosäuresequenz kann daher angenommen werden, dass diese Antikörper nicht an HIV-1 Gruppe O Viren binden. Die Untersuchungen der Inhibierung der Transzytose durch 2G12 oder 2F5 wurde aufgrund dieser Ergebnisse nur mit HIV-1_{IIIB} durchgeführt.

3.6.1 Transzytose in Anwesenheit humaner monoklonaler Antikörper

Die Transzytoseversuche in Anwesenheit der jeweiligen humanen monoklonalen Antikörper wurden, wie im Kapitel 2.3.3 im Methodenteil beschrieben mit FL-Zellen und zum Teil mit CaCo-2-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich eine deutlich geringere Transportrate durch CaCo-2-Zellen im Vergleich zu FL-Zellen, die folgend dargestellten Ergebnisse beziehen sich daher fast ausschließlich auf die Versuche mit FL-Zellen. Die mit CaCo-2-Zellen durchgeführten Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse. Der Einfluss der Antikörper auf die Transzytose wurde entweder in Ansätzen mit einer Inkubation der jeweiligen Antikörper mit HIV-1_{IIIB} (Abbildung 13a) [Hocini *et al.* 2001] oder in Ansätzen mit einer Inkubation der jeweiligen Antikörper mit den auf den Filtern gewachsenen FL-Zellen vor Beginn der Transzytose untersucht (Abbildung 13b) [Alfsen *et al.* 2001, Hocini *et al.* 1997].

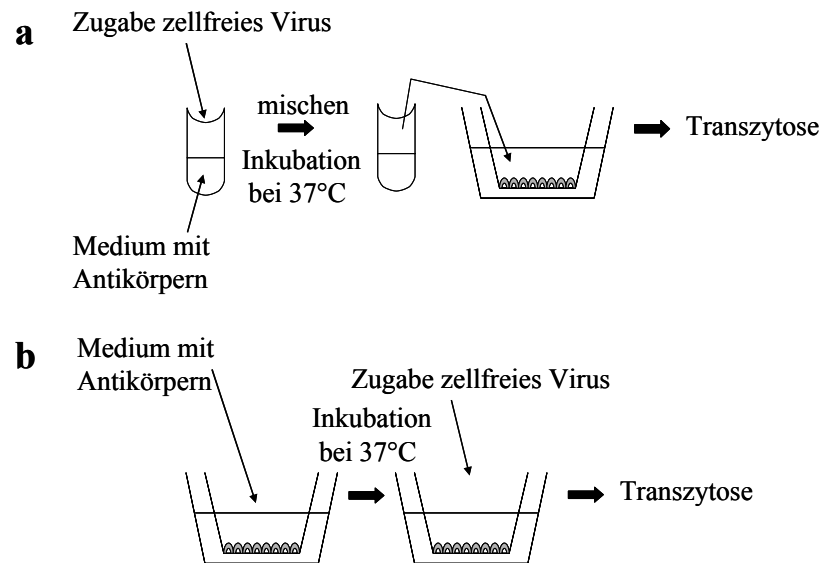


Abb. 13: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführungen **a:** Inkubation der jeweiligen Antikörper mit der Virussuspension vor Beginn der Transzytose, Start der Transzytose nach Überführen der Lösung ins obere Kompartiment, **b:** Inkubation der jeweiligen Antikörper mit den epithelialen Zellen vor Beginn der Transzytose, die Transzytose wurde durch Zufügen der Virussuspension gestartet.

Bei den Versuchen mit einer Inkubation der Antikörper mit HIV-1_{III}B vor Beginn der Transzytose wurden 20 µg der Antikörper mit einer 1:10-Verdünnung des Virusstocks für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Hierbei sollte eine Bindung der Antikörper an gp120 bzw. gp41 der HI-Viren erfolgen. Danach wurde die Lösung in das obere Kompartiment der mit Epithelzellen bewachsenen Filter gegeben und somit die Transzytose gestartet. Nach 120 Minuten wurde das Medium aus dem unteren Kompartiment entnommen und über RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und anschließender TaqMan™-PCR die Menge an transportierten Viruspartikeln bestimmt. Die Menge an transportierten infektiösen Virus der gleichen Probe aus dem unteren Kompartiment wurde durch Infektion von CEM×174-Zellen mit einer DNA-Extraktion nach 10 Tagen Kultivierung und anschließender TaqMan™-PCR ermittelt. Zu jedem Versuch wurde eine Kontrolle ohne Antikörper mitgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde die Menge an transportierten Partikeln und infektiösen Viren in der Kontrolle als 100 % Transzytose gesetzt und die Werte aus den parallel angesetzten Versuchen mit den Antikörpern darauf bezogen. Die Auswertung der Versuche ergab, dass in Anwesenheit von 2F5 der Transport von HIV-1 Partikeln nur um etwa 14% ($86\% \pm 21\%$) reduziert wurde, die Versuche mit 2G12 dagegen ergaben keine Reduktion der Transportrate im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in Anwesenheit von 2F5 die Menge an nachweisbaren infektiösen Viren im unteren

Kompartiment auf 52% ($\pm 26\%$) und in Anwesenheit von 2G12 auf 34% ($\pm 18\%$) reduziert (Abb. 14). Diese Reduktion des Infektiositätstiters lässt sich durch die neutralisierende Kapazität der Antikörper erklären.

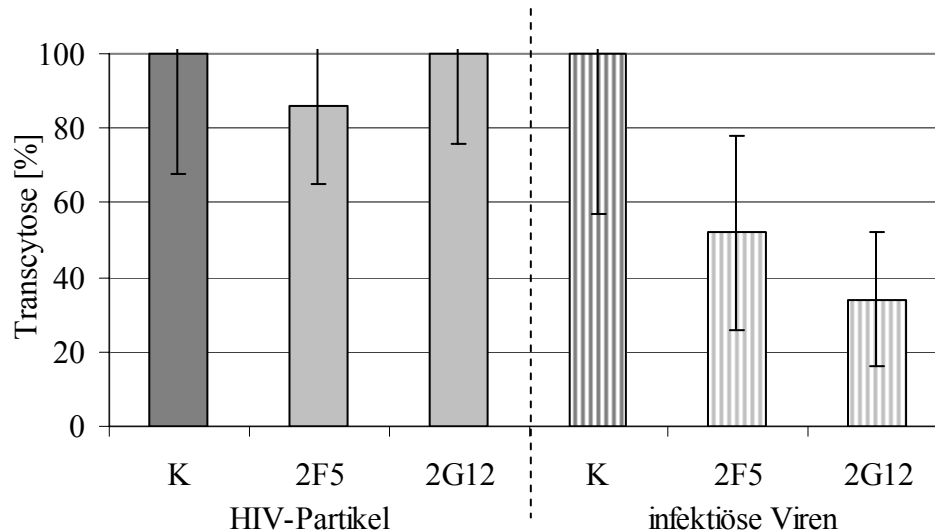


Abb. 14: Einfluss der monoklonalen Antikörper 2F5 und 2G12 auf die Transzytose von HIV-1_{IIIB}, Inkubation von HIV-1_{IIIB} mit dem jeweiligen Antikörper vor Versuchsbeginn, die Menge an transportierten HIV-Partikeln wurde über die TaqMan™-PCR ermittelt, die Titerbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, K = Kontrolle. Die angegebenen Transzytoseraten sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Zusätzlich wurden die Versuche noch mit einer Inkubation der jeweiligen Antikörper mit den FL-Zellen vor Beginn der Transzytose durchgeführt (Abb. 15). Hierbei wurde eine Lösung aus D-MEM mit 20 μ g des jeweiligen Antikörpers ins obere Kompartiment gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C wurde durch Zugabe des Virusstocks die Transzytose gestartet. Im Weiteren wurden die Versuche wie oben beschrieben durchgeführt. Auch hier konnte nur in Anwesenheit von 2F5 eine geringe Reduktion des Transports an HIV-Partikeln (auf 78% \pm 16%)) beobachtet werden, in Anwesenheit von 2G12 kam es zu keiner Reduktion. Eine Reduktion des Transportes an infektiösen HI-Viren zeigte sich bei beiden monoklonalen Antikörpern: bei 2G12 belief sie sich auf 71% ($\pm 27\%$) und bei 2F5 auf 66% ($\pm 26\%$). Aufgrund der Ergebnisse über den Transport an HIV-Partikeln in Anwesenheit der monoklonalen Antikörper kann davon ausgegangen werden, dass der Transport von HIV-1-Viruspartikeln durch Epithelzellen durch diese Antikörper nicht inhibiert werden kann. Die Reduktion des Titers an infektiösen Viren kann mit der neutralisierenden Wirkung der beiden monoklonalen Antikörper erklärt werden.

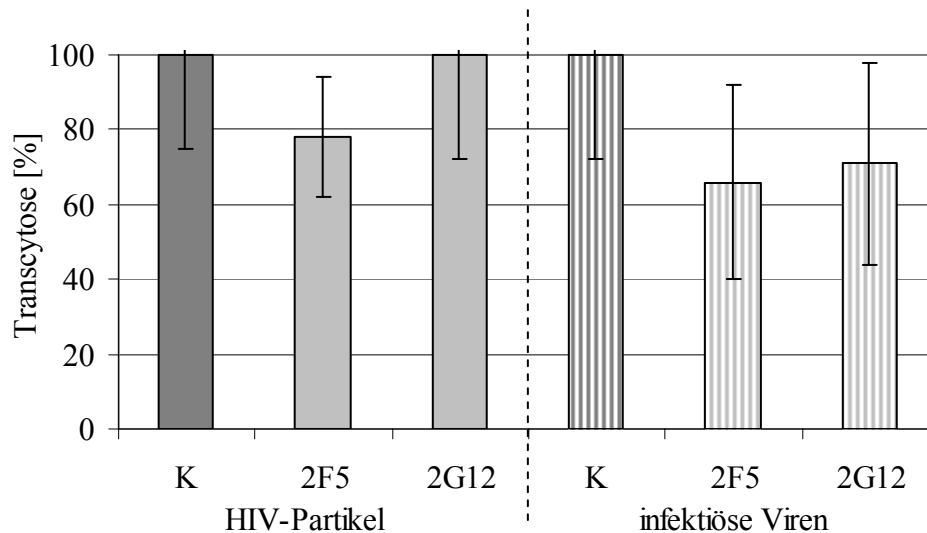


Abb. 15: Einfluss der monoklonalen Antikörper 2F5 und 2G12 auf die Transzytose von HIV-1_{IIIB}, im Gegensatz zum Versuch in Abbildung 14 wurden erst die Zellen mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert ehe die Versuche durch Zugabe von HIV-1_{IIIB} gestartet wurden, die Menge an transportierten HIV-Partikeln wurde über die TaqMan™-PCR ermittelt, die Titerbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, K = Kontrolle. Die angegebenen Transzytoseraten sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In den Untersuchungen von Kage *et al.* [Kage *et al.* 1998] wurde gezeigt, dass die an Antikörper gebundenen Zuckerseitenketten eine Hemmung des Virustransports bewirkte. Zur Untersuchung, welchen Einfluss der Glykoanteil der verwendeten monoklonalen Antikörper auf die Transzytose von HIV-1_{IIIB} besitzt, wurden daher beide Antikörper mit N-Glycosidase F behandelt (siehe 2.3.9). Im Synzythien-Inhibierungsassay wurden die deglykosylierten Antikörper auf ihre neutralisierende Wirkung gegenüber HIV-1_{IIIB} untersucht. Bei einer Konzentration von 20 µg deglykosylierter Antikörper pro Ansatz (gleiche Konzentration wie in den Transzytoseversuchen) konnte keine Veränderung der neutralisierenden Wirkung im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Antikörpern festgestellt werden. Die deglykosylierten Antikörper wurden in die Transzytoseversuche mit einer Vorinkubation der Zellen mit den Antikörpern eingesetzt. Parallel wurden Antikörper nach dem gleichen Protokoll mit anschließender Dialyse nur ohne Zugabe der Glycosidase F behandelt und ebenfalls in die Transzytoseversuche eingesetzt. Als epitheliale Zellen wurden bei diesen Versuchen CaCo-2-Zellen verwendet. In der Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt, da es sich bei den Versuchen nur um Doppelwerte handelt konnte keine Standardabweichung angegeben werden. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der transportierten Partikel mit der TaqMan™-PCR. In Anwesenheit des nicht-deglykosylierten

Antikörpers 2F5 wurde der Transport auf 75% und bei 2G12 auf 78% im Vergleich zum Kontrollansatz reduziert. Wurden die Versuche mit den deglykosylierten Antikörpern durchgeführt, konnte kein Unterschied in der Transportrate zu den Kontrollen festgestellt werden. Die beobachtete Hemmung der Transzytose von Viruspartikeln durch die Antikörper beruht im Wesentlichen auf der Wirkung der Zuckerseitenketten.

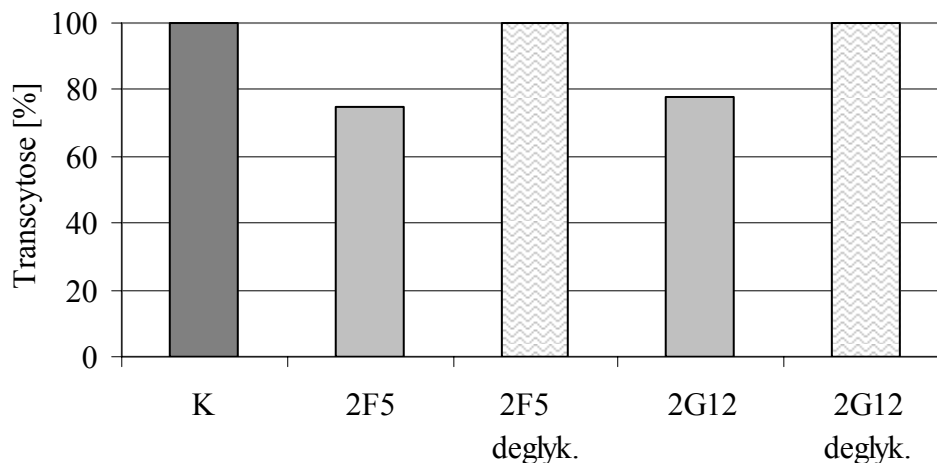


Abb. 16: Einfluss von 2F5, 2F5 deglykosyliert (deglyk.), 2G12 und 2G12 deglykosyliert (deglyk.) auf den Transport von HIV-1_{IIIB}, Inkubation der jeweiligen Antikörper mit den CaCo-2-Zellen vor Beginn der Transzytose, Ermittlung der Menge an transportierten HIV-Partikel über TaqMan™-PCR, K = Kontrolle.

3.7 Einfluss humaner Seren auf den Transport von Viren

3.7.1 Transzytose in Anwesenheit humaner Seren

Die beiden neutralisierenden mAk waren nicht in der Lage den Transport von HIV-1-Partikeln durch epitheliale Zellen signifikant zu hemmen. Es stellte sich die Frage, ob humane, polyklonale Antikörper, die gegen die Oberflächenproteine von HIV gerichtet sind, die Transzytose beeinflussen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei Seren von HIV-infizierten Probanden ausgewählt, die im Western Blot deutliche Banden gegen gp120 aufwiesen. Da die Transzytose durch Serumbestandteile gehemmt werden kann, wurden parallel Versuche mit HIV-1 negativen Seren durchgeführt. Wie die Versuche mit den monoklonalen Antikörpern wurden auch hier die Versuche mit einer Vorinkubation der Viren (Abbildung 13a) bzw. der Zellen mit Serum (Abbildung 13b) vor Beginn der Transzytose angesetzt.

Für die Versuche mit vorheriger Inkubation von Serum und HIV-1_{IIIB} wurden 30 µl Serum auf ein Gesamtvolumen von 300 µl eingesetzt (Abb. 17). Die jeweiligen Seren wurden mit einer 1:10 Verdünnung des Virusstocks in D-MEM versetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Weiteren wurden die Versuche wie im Kapitel 3.5.2 beschrieben durchgeführt.

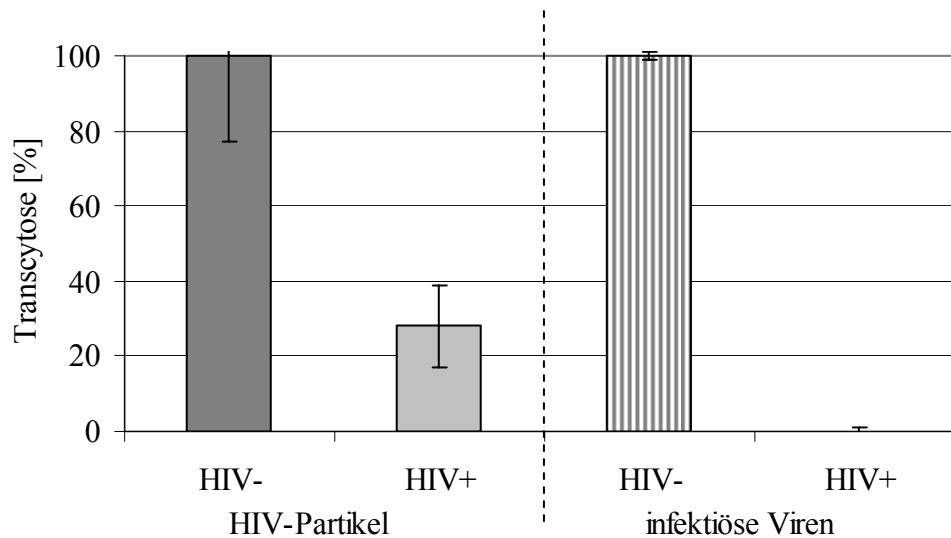


Abb. 17: Einfluss von HIV-1 negativen (HIV-) und HIV-1 positiven (HIV+) Serum auf den Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen, Inkubation von HIV-1_{IIIB} mit dem jeweiligen Serum vor Versuchsbeginn, die Menge an transportierten HIV-1-Partikeln wurde über die TaqMan™-PCR ermittelt, die Titerbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Zur Auswertung der Versuche wurde die Menge an transportierten Viren in den Versuchen mit HIV-1 negativen Seren als 100% Transzytose gesetzt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

In Anwesenheit von HIV-1 negativem Serum wurde die Transzytose von HIV-1 Partikeln im Vergleich zur Kontrolle ohne Serum im Ansatz um etwa 15% reduziert. Durch vorherige Inkubation der Viren mit Serum HIV-1 infizierter Individuen konnte der Transport von HIV-1_{IIIB} um etwa den Faktor 3,3 (auf 31%) im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Serum reduziert werden. Setzt man die transportierten Viruspartikel in den Versuchen mit HIV-1 negativen Seren als 100%, so reduziert sich in Anwesenheit von HIV-1 positiven Seren die Transzytoserate auf $36 \pm 11\%$. Die Inhibierung der Transzytose in Anwesenheit von Serum HIV-1 infizierter Personen wurde bei Betrachtung der Reduktion des Transportes an infektiösen Viren deutlicher. In Anwesenheit positiver Seren konnte im unteren Kompartiment nur noch 0,06% der infektiösen Viren im Vergleich zu den Kontrollversuchen nachgewiesen werden, während in den Versuchen mit HIV-negativen Serum noch 52% ermittelt werden konnte.

Viel deutlicher wird die inhibierende Wirkung der Seren HIV-1 infizierter Individuen bei einer vorherigen Inkubation der Seren mit FL-Zellen bevor durch Zugabe des Virusstocks die Transzytose gestartet wurde. Hier konnte der Transport von HIV-1 Partikeln in Anwesenheit des negativen Serums auf 41% gesenkt werden, in Anwesenheit des positiven Serums auf 3%. Wird die Menge an transportierten Viruspartikeln in den Versuchen mit HIV-1 negativen Seren als 100% Transzytose gesetzt, erhält man eine Reduktion des Transportes durch Serum HIV-1 infizierter Personen um etwa den Faktor 16 (auf $6 \pm 1\%$, Abb. 18).

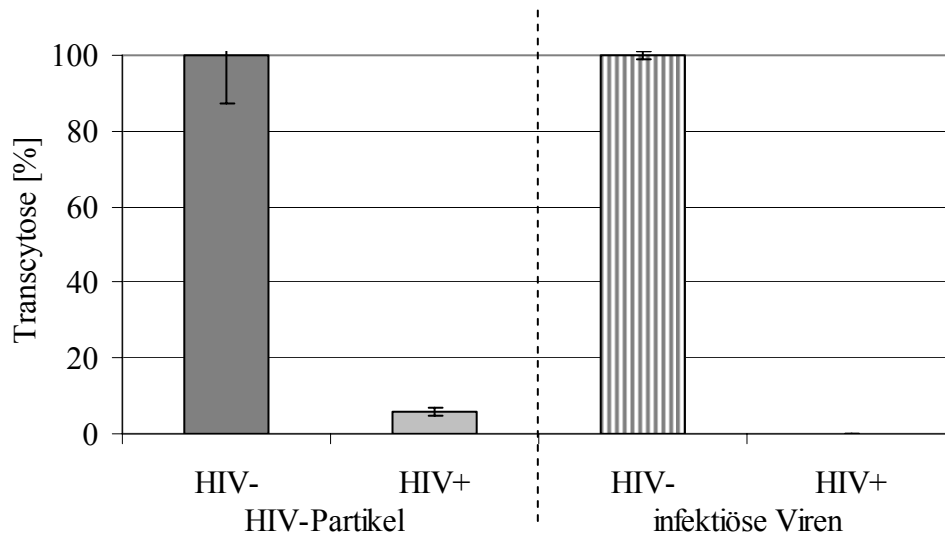


Abb. 18: Einfluss von HIV-1 negativen (HIV-) und HIV-1 positiven (HIV+) Serum auf den Transport von HIV-1_{III}B durch FL-Zellen, Inkubation der FL-Zellen mit dem jeweiligen Serum vor Versuchsbeginn, die Menge an transportierten HIV-Partikeln wurde über die TaqMan™-PCR ermittelt und die Titerbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Zur Auswertung der Versuche wurde die Menge an transportierten Viren in den Versuchen mit HIV-1 negativen Seren als 100% Transzytose gesetzt. Die Angaben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Während bei den ermittelten Werten sich die beiden verwendeten Seren in der Inhibition nicht unterscheiden, gibt es hier bei der Reduktion des Titers an infektiösen Viren unterschiedliche Ergebnisse. Serum 1 (99-3090) inhibierte den Transport um den Faktor 500, während der Faktor bei Serum 2 (01-0163) noch höher war und kein Virus mehr nachgewiesen werden konnte. HIV-negatives Serum inhibierte den Transport infektiöser Viren nur um etwa Faktor 2. Die Inhibition durch die Normalseren könnte wieder auf die Anwesenheit der Glykoseitenketten der im Serum vorhandenen Proteine zurückzuführen sein. Ein Erklärungsansatz für die Inhibition des Transportes in Anwesenheit von Seren HIV-1 infizierter Personen wäre das Vorhandensein von polyklonalen Antikörpern, die gegen die in

den Transport von HIV-1 durch Epithelzellen involvierte Domäne auf gp120 gerichtet sind. Für die Transzytoseversuche wurden Seren verwendet, die über deutliche Mengen an Antikörpern gegen gp120 - gemessen im Western Blot - verfügen, unabhängig vom Infektionszeitpunkt und –stadium des Patienten. Zur Klärung der Frage, ob und zu welchen Zeitpunkt der Infektion diese Antikörper gebildet werden, wurden die Transzytoseversuche mit Plasmen einer dokumentierten Serokonversion und mit Seren zweier Langzeitinfizierter LTNP (= Long Term Non-Progressor) durchgeführt. LTNP- Seren wurden nach folgenden Kriterien ausgesucht: 1. bekannter Infektionszeitpunkt (sogenannter „Follow-up“) 2. deutliche Reaktion der Antikörper im Western Blot gegen gp41, gp120 und gp160 und 3. kein nachweisbares p24-Antigen. Die Tabelle 20 zeigt die Western Blot- (Genelab® HIV-1 Western Blot) und ELISA-Ergebnisse (Murex HIV-ELISA) der verwendeten Seren bzw. Plasmen sowie die Viruslast.

Tab. 20: Western Blot, ELISA-Daten und Viruslast der Serokonversion (Plasmen A bis E) bzw. Langzeitinfizierten (LTNP).

	A	B	C	D	E	LTNP
gp 41 Abs	—	—	—	—	—	+
gp 120 Abs	—	—	((+))	—	(+)	+
gp 160 Abs	—	—	(+)	+	+	+
p 24 Abs	(+)	+	+	+	+	((+))
p 24 Ag	—	+	+	—	—	—
ELISA	—	((+))	+	+	+	+
Viruslast	—	$1,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	nb

Die Bestimmung der Viruslast erfolgte in der TaqMan™-PCR nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese (Angabe der Viruslast in Kopien/ml Plasma), Abs = Antikörper, Ag = Antigen, nb = nicht bestimmt, A-E = Seren einer dokumentierten Serokonversion in der Reihenfolge ihrer Abnahme, LTNP = Seren von „Long-Term Non-Progressor“, + = positiv/reaktiv, (+) = schwach positiv/reaktiv, ((+)) = fraglich, — = negativ.

Bei Plasma A bis E handelt es sich um eine dokumentierte Serokonversion in Reihenfolge der Abnahme und bei LTNP um die Seren Langzeitinfizierter. Zur Viruslastbestimmung wurden aus dem Pellet von 200 µl des jeweiligen Plasmas nach Zentrifugation für 90 Minuten bei $15.800 \times g$ die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zur Quantifizierung in die HIV-1 Gruppe M *env*-TaqMan™-PCR eingesetzt. Die ermittelten Kopienzahlen wurden auf 1 ml Plasma umgerechnet. Aufgrund der deutlicheren Inhibierung des HIV-Partikeltransportes in den bisher durchgeführten Versuchen wurde nur die Menge an transportierten Viruspartikeln über die TaqMan™-PCR bestimmt. In der Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Transzytosen in Anwesenheit der Plasmen der Serokonversion (A-E) und der Seren zweier

Langzeitinfizierter (LTNP1 und 2) veranschaulicht. In der Darstellung wurde die Menge an transportierten HIV-Partikeln in den Ansätzen mit HIV-negativen Serum als 100%-Transzytose gesetzt und die Werte der übrigen Seren oder Plasmen darauf bezogen.

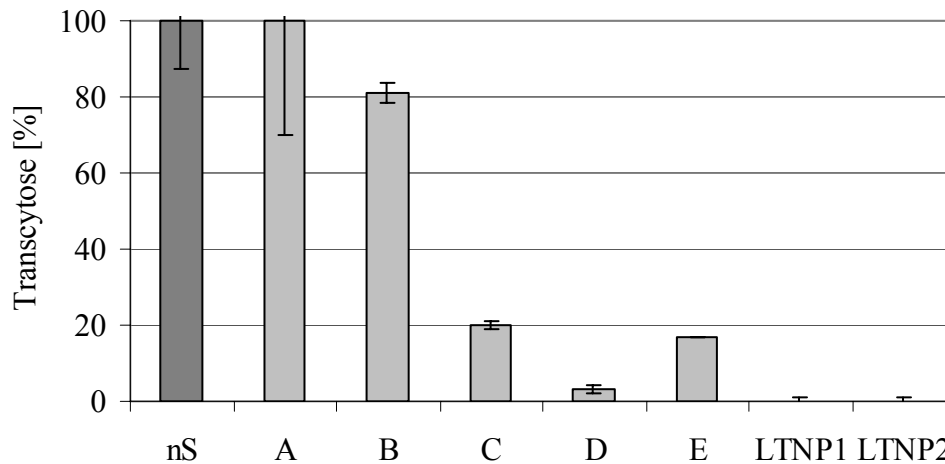


Abb. 19: Einfluss von Plasmen einer dokumentierten Serokonversion (A bis E) und von Seren zweier Langzeitinfizierter (LTNP1 und 2) auf den Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen, zur Auswertung der Versuche wurde die Menge an transportierten HIV-1-Partikeln (Bestimmung über TaqMan™-PCR) im Vergleich zu HIV-negativen Serum bestimmt (nS = 100%-Transzytose). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Es wurden Plasmen der Serokonversion eingesetzt, die weder über eine Viruslast noch über Antikörper gegen HIV-1 verfügen (Plasma A), die über eine Viruslast aber nicht über Antikörper gegen die Hüllproteine von HIV-1 verfügen (Plasma B) und die über eine Viruslast und unterschiedliche Mengen an Antikörpern gegen die Hüllproteine verfügen (Plasma C, D und E). Plasma A inhibierte die Transzytose erwartungsgemäß nicht im Vergleich zum HIV-1 negativen Serum. Plasma B inhibierte die Transzytose geringfügig, aber nicht signifikant (auf $81 \pm 3\%$). Plasma C, D und E hemmten die Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen signifikant (zwischen 80 und 97 % Hemmung), jedoch nicht so deutlich, wie die Seren der Langzeitinfizierten ($99,4 \pm 1\%$). Während die Seren der Serokonversion über eine geringe Menge an Antikörpern gegen gp120 verfügen, wurden die Seren Langzeitinfizierter nach dem Kriterium ausgewählt, eine deutliche gp120-Bande im Western Blot zu besitzen. Bei der Auswertung der Versuche mit den Plasmen der Serokonversion muss jedoch beachtet werden, dass die Plasmen unterschiedliche Mengen an freien Viren

gemessen mit der TaqMan™-PCR nach RNA-Extraktion aus den jeweiligen Plasmen beinhalten. Durch die in den Plasmen vorkommenden Viren bzw. vorkommendes freies gp120 könnte die gemessene Inhibierung der Transzytose ebenfalls erklärt werden. Die Ergebnisse der Transzytoseversuche mit Plasma B zeigten jedoch, dass die relativ hohe Viruslast von $1,8 \times 10^5$ Kopien/ml keinen signifikanten Einfluss auf die Transportrate in den durchgeführten Transzytoseversuchen besitzt. Durch dieses Ergebnis kann die signifikante Inhibierung der Transzytose durch die Plasmen C (Viruslast $2,9 \times 10^6$ Kopien/ml), D (Viruslast $1,3 \times 10^5$ Kopien/ml) und E (Viruslast $1,1 \times 10^5$ Kopien/ml) durch die vorhandenen Antikörper gegen gp120 und gp160 erklärt werden. Die Auswertung der Versuche hat gezeigt, dass Seren bzw. Plasmen der frühen als auch der späten Infektionsphase die Transzytose von HIV-1 inhibieren können. Es konnte durch die Untersuchung von Serum oder Plasma der Serokonversion gezeigt werden, dass schon früh nach Infektion Antikörper entwickelt werden, die gegen die Domäne auf gp120 gerichtet sind, die an dem Transport von HIV-1 durch Epithelzellen beteiligt ist. Zudem kann mit den Probenpanel des Serokonverters, welches sowohl Seren ohne Antikörper gegen gp120 und ohne Inhibierungseffizienz als auch Seren mit Antikörpern gegen gp120 und mit einer Inhibierungseffizienz beinhalten, ausgeschlossen werden, dass Bestandteile in den Seren die Transzytose von HIV-1 durch epitheliale Zellen unspezifisch hemmen.

3.7.2 Untersuchung der Seren und Plasmen auf neutralisierende Antikörper

Nachdem eine inhibierende Wirkung der Seren HIV-infizierter Personen nachgewiesen werden konnte, wurden die Seren auf Anwesenheit neutralisierender Antikörper untersucht. Hierzu wurde der Synzythien-Inhibierungsassay SIA, wie im Methodenteil unter 2.3.8 beschrieben, durchgeführt. Es wurden alle in den Transzytoseversuchen verwendeten Seren – negative und positive – in den SIA eingesetzt. Dabei wurden die Patientenseren nur auf neutralisierende Antikörper gegen HIV-1_{IIIB} getestet. In nur einem Serum eines Langzeitinfizierten konnten neutralisierende Antikörper gegen HIV-1_{IIIB} nachgewiesen werden. Alle anderen besitzen wie erwartet keine im SIA nachweisbaren neutralisierenden Antikörper gegen das verwendete HIV-1 Isolat. Die Ergebnisse des SIA zeigen, dass unter Berücksichtigung der Annahme, dass die Inhibierung der Transzytose auf das Vorhandensein von spezifischen gegen das in den Transport involvierte Epitop gerichtete Antikörper beruht, diese inhibierenden Antikörper keine neutralisierende Wirkung auf HIV-1_{IIIB} besitzen. Sowohl die Untersuchungen mit den neutralisierenden, monoklonalen Antikörpern als auch mit Seren

HIV-Infizierter belegen, dass neutralisierende Epitope und die postulierte am Transport beteiligte Domäne auf gp120 unterschiedliche Strukturen auf gp120 darstellen.

3.8 Expression von gp120 in unterschiedlichen Expressionssystemen

Es sollten die Epitope, welche die Transzytose von HIV-1_{IIIB} vermitteln, auf gp120 lokalisiert werden. Die Arbeit von Kage *et al.* [Kage *et al.* 1998] hat gezeigt, dass aufgereinigtes gp120 aus Kulturüberständen HIV-infizierter Zellen gekoppelt an Mikrobeads durch Epithelzellen transportiert wird. Diese Beobachtung sollte zur Identifizierung der für den Transport von HIV-1 durch epitheliale Zellen verantwortlichen Domäne auf gp120 herangezogen werden. Hierfür sollte rekombinantes gp120 in unterschiedlichen Expressionssystemen hergestellt werden. Durch Expression in *E. coli* erhält man unglykosyliertes gp120, im Baculovirussystem oder nach Expression in Säugerzellen glykosyliertes gp120. Nach Kopplung an fluoreszierende Mikrobeads sollte untersucht werden, ob die mit unglykosylierten bzw. glykosylierten gentechnisch hergestellten gp120 beladenen Mikrobeads durch Epithelzellen transportiert werden. Es sollte mit dem Expressionssystem weiter gearbeitet werden, bei dem das an Mikrobeads gekoppelte rekombinante gp120 den Transport durch epitheliale Zellen initiieren kann. Nach gezielter Mutagenese sollten dann die exprimierten Proteine gereinigt, an Beads gekoppelt und in Transzytoseversuche eingesetzt werden.

3.8.1 Expression von gp120 in *E. coli*

Mittels PCR wurde das *env*-Fragment amplifiziert und in das Plasmid pQE 90s kloniert. Nach Überprüfung durch Sequenzierung wurde der Klon, welcher die vollständige und korrekte *env*-Sequenz enthielt, zur Proteinexpression eingesetzt. Die Expression von gp120 wurde mit Hilfe des Western Blots (siehe 2.2.1.14) untersucht. Anschließend wurde gp120 über den His-Tag unter denaturierenden und nativen Bedingungen über eine Nickelsäule aufgereinigt. Die Menge an gp120 aufgereinigt unter nativen Bedingungen (1000 ml Ansatz, Proteinmenge unter der Nachweisgrenze) war so gering, dass eine Kopplung an Mikrobeads nicht möglich war. Eine Kopplung an Mikrobeads erfolgte nur mit dem unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigtem gp120. Hier lag die Ausbeute aus einem 500 ml Ansatz bei 340 ng aufgereinigtem Protein. Die gekoppelten Mikrobeads wurden anschließend in die Transzytoseversuche eingesetzt. Die Versuche wurden wie im Kapitel 2.3.3 beschrieben durchgeführt, anstelle von zellfreien Viren wurden die gekoppelten Mikrobeads eingesetzt. Als Kontrolle dienten Glycin-gekoppelte Beads. Nach Beendigung der Transzytose nach 120

Minuten wurde das Medium im unteren Kompartiment entnommen und die Fluoreszenz in einem Fluoreszenzphotometer (TECAN SPECTRAFluor Plus, Extinktionsfilter 535 nm, Emissionsfilter 595 nm) bestimmt. Ebenso wurden die Ausgangsfluoreszenz und die Fluoreszenz im oberen Kompartiment nach Ablauf des Versuchs ermittelt. Die Versuche ergaben, dass weder die Glycin-gekoppelten noch die gp120-gekoppelten Beads durch die Epithelzellen transportiert wurden. Das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte gp120 kann den Transport durch Epithelzellen nicht initiieren. Eine Durchführung der Versuche mit nativen gp120 war aufgrund der geringen Ausbeute nicht möglich. Auch durch Wechsel des Plasmids und Klonierung des *env*-Fragmentes in pASK-IBA-Vektoren mit der Möglichkeit der Aufreinigung über einen *Strep*-Tag[®] konnten keine ausreichenden Mengen nicht denaturiertes gp120 hergestellt werden.

3.8.2 Expression von gp120 im Baculovirussystem

Nach der Klonierung des *env*-Fragmentes in pFast His und pTriEx 3 wurden die Plasmide zur Expression ins Rheumaforschungszentrum gegeben. Die mit Baculovirus infizierten Insektenzellen (Sf9) wurden im Robert Koch-Institut auf die Expression von gp120 mit Hilfe des Western Blots untersucht. Es konnte in den Zellen zwar gp120 nachgewiesen werden, jedoch erwies sich hier ebenfalls die Aufreinigung als Problem. Es war nicht möglich unter nativen Bedingungen ausreichende Mengen an Protein aufzureinigen.

3.8.3 Expression von gp120 in Säugerzellen

Die Expression von gp120 in Säugerzellen wurde mit unterschiedlichen Plasmiden in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt, um ein System mit einer möglichst hohen Ausbeute an rekombinanten gp120 zu erhalten. Die Zellen wurden mit Hilfe der APAAP (*Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase*)-Methode und des Western Blots auf Expression von gp120 untersucht. Hier lag die Expressionsrate deutlich unter den Expressionsraten der anderen Expressionssysteme. Aufgrund der geringen Expression und der Probleme bei der Aufreinigung über His-Tag oder *Strep*-Tag[®] konnte auch hier nicht genügend natives gp120 zur Kopplung an Mikrobeads aufgereinigt werden.

Die Untersuchung der für den Transport durch die Epithelzellen verantwortlichen Bereiche auf gp120 über gentechnisch hergestelltem und mutiertem gp120 war aufgrund der geringen Ausbeute bei der Aufreinigung unter nativen Bedingungen in den verwendeten Expressionssystemen nicht möglich.

3.9 Identifizierung der in den Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen involvierten Domäne auf gp120

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Oligopeptide, die sich von der Sequenz des gp120 ableiten, in der Lage sind, den Transport von HIV-1 durch Zellen zu inhibieren. Im Rahmen des Europäischen Verbundes war es möglich beim EU Programme EVA/MRC Centralised Facility for AIDS Reagents; NIBSC, UK überlappende Peptide (20-mer) von HIV-1 gp120 (Grant Number QLK2-CT-1999-00609 and GP828102) zu erhalten.

3.9.1 Überlappende Oligopeptide von HIV-1

Die überlappenden Oligopeptide (Bestellnummern ARP7035 und ARP740) basieren auf den Aminosäuresequenzen von gp120 zweier verschiedener HIV-1 Isolate. Ein Satz Oligopeptide besteht aus 47 (ARP740.1-.47) bzw. 48 (ARP7035.1-.48) Peptiden mit einer Länge von 20 Aminosäuren, die jeweils mit einem Bereich von 10 Aminosäuren überlappen. Die Aminosäuresequenz der Oligopeptide ARP740 (Tabelle 28 im Anhang) leiten sich von der Aminosäuresequenz des HIV-1 Subtyp B-Isolates HxB2-1A ab. Bei ARP7035 basiert die Sequenz auf dem molekularen Klon ACH320.3.1/W61D aus dem Dutchfield Isolat von HIV-1 (ACH320). Pro Oligopeptid wurde 1 mg geliefert und daraus eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO hergestellt. In die Transzytoseversuche wurden zunächst nur die Oligopeptide des HxB2-1A-Isolats (ARP740.n) eingesetzt, da hier die größte Homologie zum verwendeten HIV-1_{IIIB}-Laborisolat vorlag. Im Bereich von gp120 besteht zwischen den aus den Oligopeptiden gebildeten Aminosäuresequenz und der von HIV-1_{IIIB} [Wain-Hobson *et al.* 1985] eine Homologie von etwa 90%.

3.9.2 Transzytose in Anwesenheit der Oligopeptide ARP740

Aus Praktikabilitätsgründen wurden die Oligopeptide in zehn Gruppen (Pools) mit in der Regel fünf aufeinander folgenden Oligopeptiden unterteilt (Tabelle 21) und jeder Pool in die Transzytoseversuche eingesetzt. Die in der Tabelle 21 unterstrichenen Oligopeptide konnten nicht in DMSO gelöst werden und wurden daher nicht untersucht. Die Transzytoseversuche wurden mit FL-Zellen wie im Kapitel 2.3.3 beschrieben durchgeführt. Zu Beginn der Versuche wurden die Zellen mit den jeweiligen Pools zur Absättigung der für den Transport wichtigen Rezeptoren für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Tab. 21: Einteilung der Oligopeptide ARP740 in die verschiedenen Pools.

Pool	Nummer der Oligopeptide	Pool	Nummer der Oligopeptide
1	ARP740.1, .2, .3, .4, .5	6	ARP740.26, <u>.27</u> , <u>.28</u> , .29, .30
2	ARP740.6, .7, .8, .9, .10	7	ARP740.31, .32, .33, .34, .35/36
3	ARP740.11, .12, .13, .14, .15	8	ARP740.37, .38, .39, .40
4	ARP740.16, .17, .18, .19, .20	9	ARP740.41, .42, .43, .44, .45
5	ARP740.21, .22, .23, <u>.24</u> , .25	10	ARP740.46, <u>.47</u>

Unterstrichene Oligopeptide ließen sich nicht in DMSO lösen und wurden daher nicht in die Versuche eingesetzt. Die Endkonzentration der einzelnen Oligopeptide im Versuchsansatz war 20 µM, die von DMSO 1%. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass 1 % DMSO im Kulturmedium von den FL-Zellen toleriert wurde und keinen Einfluss auf den Transport von Viren hat. Die Transzytose wurde durch Zugabe von HIV-1_{IIIB} gestartet und jeweils nach 120 und 240 Minuten das Medium aus dem unteren Kompartiment abgenommen und die transportierte Virusmenge über eine Endstufentitration bestimmt. Parallel zu den Versuchsansätzen mit Oligopeptiden wurden Kontrollen mit 1% DMSO durchgeführt. Die in den Kontrollansätzen ermittelte Menge an transportierten Viren wurde als 100%-Transzytose gesetzt und die in den Versuchsansätzen ermittelten Werte darauf bezogen. Die Abbildung 20 fasst die Ergebnisse der Versuche mit den einzelnen Oligopeptidpools zusammen. In Anwesenheit des Oligopeptidpools 7 konnte der Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen auf $12 \pm 1\%$ des Transportes in den Kontrollansätzen reduziert werden, in Anwesenheit des Oligopeptidpools 8 sogar auf $5 \pm 2\%$. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oligopeptide der Pools 7 und 8 in der Lage sind, den Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen signifikant zu inhibieren.

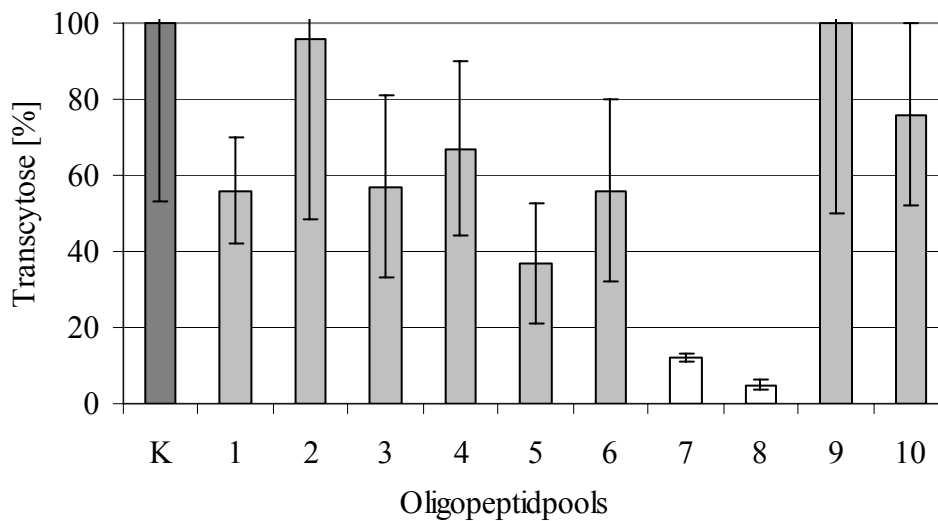


Abb. 20: Einfluss von gp120-Oligopeptiden auf die Transzytose von HIV-1_{IIB} durch FL-Zellen, Angabe in %-Transzytose bezogen auf Kontrollansatz ohne Oligopeptide (100% Transzytose) nach 240 Minuten, Auswertung über Endstufentitration des Mediums im unteren Kompartiment, K = Kontrolle, Ziffern 1 – 10 = Oligopeptidpools (siehe Tabelle 21). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von wenigstens drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse aus der Titration konnten mit den Ergebnissen aus der TaqMan™-PCR bestätigt werden (Tabelle 22), wobei die gemessenen Werte eine noch deutlichere Inhibierung nachwiesen.

Tab. 22: Ergebnisse der Transzytosen von HIV-1_{IIB} in Anwesenheit der Oligopeptidpools 7 und 8 aus ARP740.

Probe	Kopien/ μ l	%-Transzytose	%-Inhibierung
Kontrolle	$1,6 \times 10^2$	100	0
Oligopeotidpool 7	$1,5 \times 10^1$	8 ± 6	92 ± 6
Oligopeptidpool 8	$2,4 \times 10^0$	1 ± 1	99 ± 1

Angabe der gemessenen Kopienzahl/ μ l im unteren Kompartiment nach 240 Minuten, Auswertung über TaqMan™-PCR.

Zur weiteren Charakterisierung der beiden inhibierenden Pools wurden die Oligopeptidpools 7 und 8 in ihre einzelnen Oligopeptide aufgesplittet und einzeln in die Transzytose eingesetzt. Vor Beginn der Transzytose wurden die FL-Zellen mit 100 μ M der jeweiligen Oligopeptide für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die weitere Durchführung und Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Aufgrund der guten Übereinstimmung zwischen den ermittelten Werten durch Endstufentitration und TaqMan™-PCR wurde auf die zeitaufwendige Titration im

folgenden verzichtet und die Versuche ausschließlich über die TaqMan™-PCR ausgewertet. Die Abbildung 21 zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse.

Durch Vorinkubation der Zellen mit einzelnen Oligopeptiden aus gp120 kann die Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen signifikant inhibiert werden. Dabei reduzierte das Oligopeptid ARP740.34 den Transport von HIV-Partikeln auf $8 \pm 2\%$, ARP740.35/36 auf $5 \pm 3\%$ und ARP740.38 auf $6 \pm 0,5\%$ bezogen auf die Kontrollversuche ohne Oligopeptid. Die Oligopeptide ARP740.34 und ARP740.35/36 waren in Pool 7 und ARP740.38 im Pool 8 enthalten.

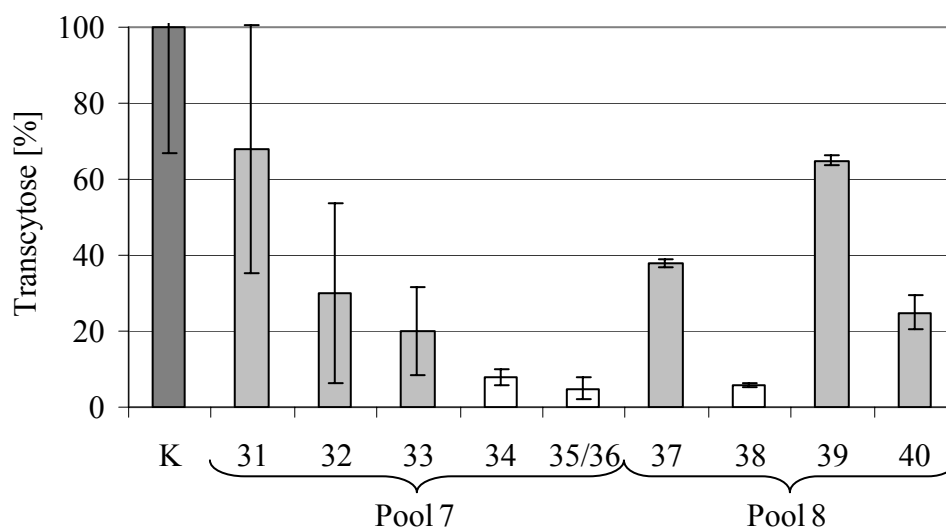


Abb. 21: Einfluss der einzelnen Oligopeptide der Oligopeptidpools 7 und 8 (siehe Tabelle 21) auf die Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen, Angabe in %-Transzytose bezogen auf Kontrollansatz ohne Oligopeptide (100% Transzytose) nach 240 Minuten, Auswertung über TaqMan™-PCR nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese aus Medium im unteren Kompartiment, K = Kontrolle, Ziffern 31-40 = einzelne Oligopeptide ARP740, angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. 100%-Transzytose entsprechen 4×10^3 Kopien/ μ l.

In den darauf folgenden Versuchen wurden die Oligopeptide 34, 35/36 und 38 gemeinsam in die Transzytose eingesetzt. Hierbei wurde auch das zwischen den inhibierenden Oligopeptiden liegende Oligopeptid ARP740.37 mit einbezogen. Die Durchführung erfolgte wie beschrieben, auch hier wurde über die TaqMan™-PCR ausgewertet. In Anwesenheit der Oligopeptide ARP740.34 bis ARP740.38 konnte der Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen um den Faktor 11 (auf $9\% \pm 3\%$) im Vergleich zur Kontrolle inhibiert werden (Abbildung 24).

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Aminosäuresequenz ermittelt (Oligopeptide ARP740.34 bis ARP740.38, Abb. 22). Die Sequenz basierend auf der Sequenz von ARP740, im weiteren Env362-420 genannt, sieht wie folgt aus:

ARP740.34 – ARP740.38: **Env362-420** (59 Aminosäuren)

```

KQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPCRI
KQSSGGDPEIVTHSFNCGGE      NSTWFNSTWSTEGSNNTEGS
  ARP740.34                  ARP740.37
                        GEFYCNSTQLFNS      TEGSNNTEGSDTITLPCRI
                        ARP740.35/36          ARP740.38

```

Abb. 22: Aminosäuresequenz der den Transport inhibierenden Domäne auf gp120, abgeleitet von ARP740, dargestellt sind zusätzlich die einzelnen inhibierenden Oligopeptide ARP740.34 bis ARP740.38, aus denen sich die Sequenz von Env362-420 zusammensetzt.

Der Aminosäuresequenz der Oligopeptide ARP740 liegt eine definierte Sequenz eines HIV-1 Subtyp B-Isolats zugrunde. Die Oligopeptide ARP7035 basieren auf der Aminosäuresequenz eines weiteren HIV-1 Subtyp B-Isolats, welche nur eine 75%ige Homologie gegenüber ARP740 im Bereich der inhibierenden Oligopeptide aufweist. Es kommt auf einer Länge von 59 Aminosäuren zu 9 Aminosäureaustauschen und 6 Deletionen. Die Abbildung 23 zeigt die Aminosäuresequenzen der korrespondierenden Oligopeptide aus ARP7035 der Aminosäuresequenz von Env362-420 gegenübergestellt.

```

ARP740.34      KQSSGGDPEIVTHSFNCGGE
ARP740.35/36   GEFFYCNSTQLFNS
ARP740.37      NSTWFNSTWSTEGSNNTEGS
ARP740.38      TEGSNNTEGSDTITLPCRI
Env362-420:  KQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGSDTITLPCRI
ARP7035.34-38: NQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNG----TEG--NNT
ARP7035.34     NQSSGGDPEIVR
ARP7035.35     SSGGDPEIVRHSFNCGGEFF
ARP7035.36     HSFNCGGEFFYCDTTQLFNS
ARP7035.37     YCDTTQLFNSTWNG----TEG--NNT
ARP7035.38     TWNG----TEG--NNTTEGSDTITLPCR-

```

Abb. 23: Sequenzvergleich der inhibierenden Oligopeptide aus ARP740 (Env362-420) und ARP7035, grau unterlegte Buchstaben bedeuten Aminosäureaustausch und grau unterlegte Striche (-) Deletionen, oberhalb der Env362-420-Sequenz sind die einzelnen Oligopeptide ARP740.34 bis ARP740.38, von denen die Sequenz von Env362-420 abgeleitet wurde und unterhalb der korrespondierenden Sequenz aus ARP7035 sind die dazugehörigen Oligopeptide ARP7035.34 bis ARP7035.38 dargestellt.

Zwischen der Aminosäuresequenz des verwendeten HIV-1_{IIIB}-Laborisolats und der Sequenz der Oligopeptide ARP7035 besteht im Bereich der inhibierenden Oligopeptide eine

Homologie von nur 56%, bei ARP740 liegt im Bereich der inhibierenden Oligopeptide eine Homologie von 100% vor. Durch Versuchsansätze mit den korrespondierenden Oligopeptiden aus ARP7035 sollte nun überprüft werden, ob auch hier eine Inhibierung der Transzytose erfolgt. Diese Untersuchungen zeigten, dass auch hier eine inhibierende Wirkung vorhanden ist. In Anwesenheit der Peptide konnte der Transport gegenüber der Kontrolle auf $11 \pm 5\%$ reduziert werden (Abbildung 24).

Für weitere Untersuchungen wurde ein Peptid der Aminosäuresequenz von Env362-420 (ARP740.34-.38), das durch Auftragssynthese hergestellt wurde, verwendet.

3.9.3 Transzytose in Anwesenheit des Peptids Env362-420

Das Peptid Env362-420 wurde zur Herstellung einer Stocklösung von 10 mM in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 100 μM in die Transzytoseversuche eingesetzt. Die Versuche wurden wie mit den Oligopeptiden beschrieben durchgeführt.

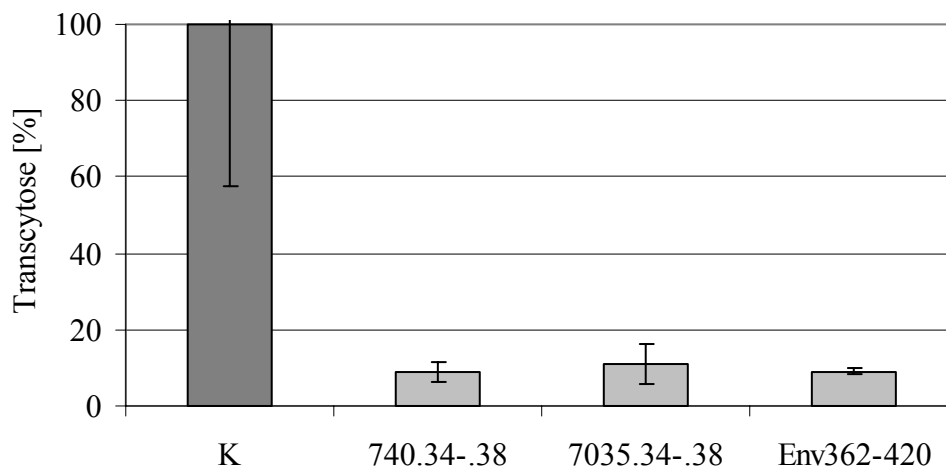


Abb. 24: Inhibierung der Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen in Anwesenheit von Env362-420 (100 μM) im Vergleich zu den Inhibierungen in Anwesenheit der inhibierenden Oligopeptide aus ARP740 und ARP7035, Auswertung über TaqMan™-PCR, Angabe in %-Transzytose bezogen auf Kontrollversuche ohne Oligopeptid bzw. Peptid, 100% Transzytose entsprechen 4×10^2 Kopien/ μl . Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) wenigstens dreier unabhängiger Versuche.

In Anwesenheit des Peptids konnte der Transport von HIV-1_{IIIB} durch Amnionzellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid auf $9\% \pm 1\%$ reduziert werden (Abbildung 24). Diese

Reduktion entspricht der Reduktion, die in Anwesenheit der Oligopeptide ARP740.34 bis .38 erreicht werden konnte.

3.9.4 Transzytose durch CaCo-2 Zellen in Anwesenheit des Peptids Env362-420

Zur Untersuchung, ob es sich bei der Inhibierung des Transportes von HIV-1 durch FL-Zellen in Anwesenheit von Env362-420 nicht um eine zellspezifische Inhibierung handelt, wurden Transzytoseversuche mit CaCo-2 als weitere Epithelzelllinie durchgeführt. Der Versuchsaufbau wurde ansonsten nicht verändert. Durch Vorinkubation der CaCo-2 Zellen mit Peptid konnte der Transport von HIV-1_{IIIB} um den Faktor 20 ($5 \pm 1\%$) im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Peptid reduziert werden (Abbildung 25). Die Versuche zeigten, dass die Rezeptoren sowohl auf FL- als auch auf CaCo-2 Zellen, die den Transport von HIV-1 durch Epithelzellen initiieren, von Env362-420 blockiert werden können.

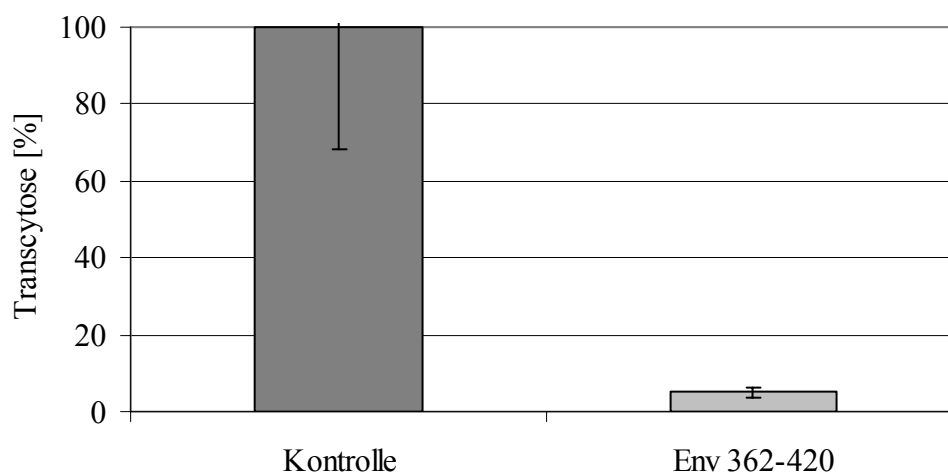


Abb. 25: Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch CaCo-2-Zellen in Anwesenheit von Env362-420, Auswertung über TaqMan™-PCR, Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) aus mindestens drei Versuchen

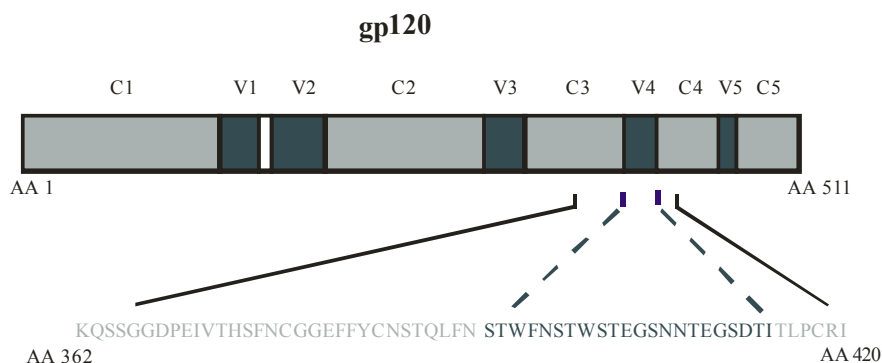
3.9.5 Einfluss des Peptids Env362-420 auf die Infektiösität

Zur Untersuchung des Einflusses von Env362-420 auf die Infektiösität wurden Versuche wie im Methodenteil unter 2.3.10 beschrieben durchgeführt. Es wurden pro Versuch je zwei Ansätze mit Peptid und zwei Kontrollansätze mit 1% DMSO angesetzt. Nach Inkubation der CEM×174-Zellen mit Env362-420 oder mit DMSO wurden die Zellen mit HIV-1_{IIIB} für 60 min inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen abzentrifugiert und eine Verdünnungsreihe

hergestellt. Zu den einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann nicht-infizierte CEM×174-Zellen hinzugegeben. Nach 11 Tagen wurde der Versuch ausgewertet und die Entwicklung des cythopatischen Effekts (CPE) in den Kontrollansätzen mit der Entwicklung in den Ansätzen mit Env362-420 verglichen. Es konnte in allen Versuchsansätzen keine Reduktion der infizierten Zellen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Env362-420 hat somit keinen nachweisbaren Einfluss auf die Infizierbarkeit der CD4⁺ CEM×174-Zellen.

3.9.6 Inhibition der Transzytose von anderen HIV-1 Subtypen

Der Transport von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen kann durch das Peptid Env362-420 inhibiert werden. Die Versuche, die zur Identifizierung dieser Domäne geführt haben, wurden mit Oligopeptiden des HIV-1 Subtyp B Isolats HxB2-1A und einem Virusstock des HIV-1 Subtyps B (HIV-1_{IIIB}: Isolat Bru Acc. Nr. K02013) durchgeführt. Zwischen der Aminosäuresequenz der Oligopeptide und der des Virusstocks liegt im Bereich von gp120 die Sequenzhomologie bei 90% und im Bereich von Env362-420 bei 100%. Aufgrund der hohen Sequenzdiversität im *env*-Gen von HIV-1, stellt sich nun die Frage, ob eine subtypen- und gruppenübergreifende Inhibierung des Transportes von HIV-1 durch FL-Zellen in Anwesenheit des Peptids möglich ist. Zunächst wurde die Aminosäuresequenz von Env362-420 mit den Konsensussequenzen ausgewählter HIV-1 Gruppe M Subtypen und der Konsensussequenz von HIV-1 Gruppe O verglichen. Die Konsensussequenzen wurden der Datenbank HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>) entnommen. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Blast-Programm über die NCBI-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) durchgeführt. In der Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Aminosäuresequenzvergleiche unter Angabe der Sequenzhomologie dargestellt. Env362-420 besitzt eine Sequenzhomologie von 81% zur Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B und zur Konsensussequenz der HIV-1 Gruppe M von 67%. Die Sequenzvergleiche zu den übrigen Subtypen der HIV-1 Gruppe M ergaben eine Homologie von nur 57% zur Konsensussequenz von Subtyp G und reichten bis zu einer Homologie von 71% zur Konsensussequenz von Subtyp D.



der Virusisolate nicht auf permanenten Zellen wächst. In der Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Transzytoseversuche mit den unterschiedlichen Subtypen in Anwesenheit von Env362-420 grafisch dargestellt. Eine Zuordnung der Transzytoseergebnisse zu den jeweils eingesetzten Virusisolaten mit Isolatbezeichnung findet sich im Anhang unter Tabelle 29. Zur Einschätzung des Inhibierungspotentials des Peptids gegenüber den HIV-1 Gruppe M- und Gruppe O-Isolaten wurde der Grafik die Inhibierung des Transportes von HIV-1_{IIIB} (Subtyp B) ebenfalls zugefügt. Bei der Auswertung der Versuche zeigte sich, dass in Anwesenheit von Env362-420 die Transzytosen der in den Versuchen verwendeten HIV-1 Gruppe M- und HIV-1 Gruppe O-Isolaten durch FL-Zellen inhibiert werden kann. Aufgrund der Aminosäuresequenzunterschiede zwischen den Sequenzen der verwendeten Viren und Env362-420 ist die Inhibierungseffizienz der Transzytose der Non-B Subtypen mindestens um den Faktor 2,6 und maximal um den Faktor 7 schlechter als mit HIV-1 Subtyp B.

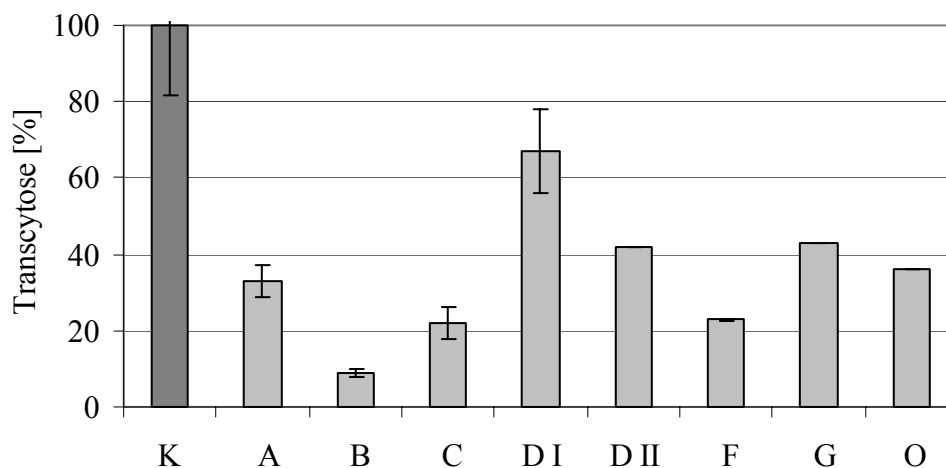


Abb. 28: Ergebnisse der Transzytoseversuche in Anwesenheit von Env362-420 mit verschiedenen HIV-1 Gruppe M und Gruppe O Isolaten durch FL-Zellen, dargestellt ist die prozentuale Transzytose bezogen auf die jeweiligen Kontrollversuche mit dem gleichen Subtyp, Auswertung über TaqMan™-PCR. Bei DI handelt es sich um das Isolat 3971/95 und bei DII um das Isolat 92UG024 des Subtyps D, K = Kontrolle, Angabe von Mittelwerten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) von mindestens drei unabhängigen Ansätzen, bei den Isolaten DII, G und O ist keine Angabe der Standardabweichung möglich, da es sich hier nur um Doppelwerte handelt.

Da die Aminosäuresequenzen der verwendeten Viren des Subtypenpanels nicht mit den Konsensussequenzen übereinstimmen, sind in Abbildung 29 die Aminosäuresequenzabgleiche zwischen Env362-420 und den verwendeten Virusisolaten

unter Angabe der Sequenzhomologie aufgeführt. Die Sequenzen der einzelnen Isolate wurden, soweit sie vorlagen, der Datenbank (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>) entnommen oder in der eigenen Arbeitsgruppe von Frau Dr. C. Kücherer sequenziert (Sequenzen freundlicherweise von Frau Dr. C. Kücherer zur Verfügung gestellt).

Env362-420		KQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTW-FNSTWSTEGSNTEGSDTITLPCR
Isolat A	71%	ANP....L..T.....TSG.....--SVNA.MQQ..S..SN.....
Isolat C	56%	AP....L..T.....R.....TSK...N.YMS---NSTN..TSTSTPD...Q...
Isolat DI	66%	.N....L..T.....TSG...I.RK.D...SD--I..T.AN-...Q...
Isolat DII	63%	.P.....T.....TSK...HSVGE.N.L.ISNGV. ---N....K.
Isolat F	61%	FN....L..TR.N...M.....TDE...D.K-..D.----.F.G-----
Isolat G	53%	NSPA...L..TA....R.....TSD..R-----..SK.DP.....
Isolat O	42%	HSIA...D..TTYMH...H.....TSKM...Y.F-ECNNTTCQ.N.I.NDNG.DWI...L

Abb. 29: Aminosäuresequenzvergleich zwischen den verwendeten Virusisolaten und dem Peptid Env362-420 (= Subtyp B), mit Angabe der Sequenzhomologie, grau unterlegt sind die über alle Isolate konservierten Aminosäuren.

Es ist an den Ergebnissen nicht zu erkennen, dass der Transport von Subtypen mit hoher Sequenzhomologie besser inhibiert wird als der Transport von Subtypen mit geringerer Homologie. Das Primärisolat 11562/96 vom HIV-1 Gruppe M Subtyp A besitzt neben Subtyp B die größte Homologie zu Env362-420, die Transzytose wird jedoch im Vergleich zu den anderen Subtypen nicht am effektivsten inhibiert. Die deutlichste Reduktion der Transzytose zeigte sich in den Versuchen mit dem Primärisolat 484/97 vom Subtyp C und 93BR020 vom Subtyp F, hier wurde der Transport auf $22 \pm 4\%$ bei Subtyp C und auf $23 \pm 0,3\%$ bei Subtyp F gegenüber den Kontrollansätzen ohne Peptid gehemmt. Dabei besitzen beide Isolate verglichen mit den anderen verwendeten Subtypen eine geringere Sequenzhomologie zu Env362-420, bei Isolat C beträgt die Homologie 56% und bei Isolat F 61%. Es wurden zwei unterschiedliche Virusisolate des Subtyps D in die Versuche eingesetzt. Bei den zuerst durchgeführten Versuchen mit Subtyp DI (3971/95) konnte der Transport nur auf $67 \pm 11\%$ reduziert werden, obwohl die Sequenzhomologie zwischen Subtyp B und D im Vergleich zu den anderen Subtypen relativ hoch ist. In den anschließend durchgeführten Versuchen mit einem weiteren D-Isolat (DII: 92UG024), welches eine etwas geringere Homologie zu Env362-420 aufwies, ließ sich der Transport durch das Peptid auf 42% reduzieren. Überraschend war, dass die Transzytose von dem Vertreter von HIV-1 Gruppe O durch Env362-420 in der gleichen Größenordnung inhibiert wurde wie die Transzytose von HIV-1 Gruppe M Subtyp A. Bei HIV-1 Gruppe O liegt nur eine Sequenzhomologie zu Env362-420 von 49% vor.

Bei der Auswertung der Versuche sollte bedacht werden, dass in die Versuche unterschiedliche Ausgangsvirusmengen eingesetzt wurden. In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Transport von HIV-1 durch Epithelzellen von der eingesetzten Virusmenge abhängig ist [Seeger 2003]. Je höher die eingesetzte Virusmenge ist, desto mehr Virus bezogen auf die Ausgangsmenge wird transportiert. Rückschlüsse aus dem Vergleich zwischen den einzelnen Versuchen mit den unterschiedlichen Subtypen untereinander sind deshalb nur bedingt möglich und vorsichtig zu diskutieren. Zusammenfassend kann postuliert werden, dass das Oligopeptid Env362-420 mit den verschiedenen HIV-1 um den Rezeptor auf den FL-Zellen konkurriert.

3.9.7 ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Env362-420 in humanen Seren/Plasmen

Es konnte gezeigt werden, dass durch Seren HIV-1 infizierter Personen die Transzytose von HIV-1 durch Amnionzellen inhibiert werden kann. Hier wurde die Hypothese aufgestellt, dass polyklonale Antikörper aus den Seren, die gegen die in den Transport involvierte Domäne auf gp120 gerichtet sind, für diese Inhibierung verantwortlich sind. Im Weiteren konnte mit Env362-420 der Transport von HIV-1 durch Epithelzellen signifikant inhibiert werden. Es stellt sich nun die Frage, ob die inhibierenden Seren über Antikörper gegen Env362-420 verfügen und somit die Hypothese der Inhibierung der Transzytose durch spezifische polyklonale Antikörper bestätigt werden kann.

Die Versuche zur Optimierung (siehe 2.4.1) geben deutliche Hinweise darauf, dass Seren HIV-1 positiver Individuen über Antikörper gegen Env362-420 verfügen können. Daher wurden nach der Optimierung eine Reihe von HIV-1 negativen und positiven Seren in den Peptid-ELISA eingesetzt. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der verwendeten HIV-positiven Seren dargestellt. Aufgeführt sind die jeweiligen Extinktionen bei einer Serumverdünnung von 1:100 abzüglich des Mittelwerts der verwendeten HIV-1 negativen Seren (16 Seren). Als Seren mit Antikörpern gegen das Peptid wurden Seren gewertet, die nach Abzug des Mittelwerts der Extinktionen der negativen Seren noch mindestens eine Extinktion von 0,1 aufwiesen. Bis auf einige Ausnahmen scheinen nur geringe Mengen an Antikörpern gegen das Oligopeptid Env362-420 in HIV-1 positiven Personen vorhanden zu sein, einige der HIV-1 positiven Seren besitzen überhaupt keine Antikörper gegen das Peptid.

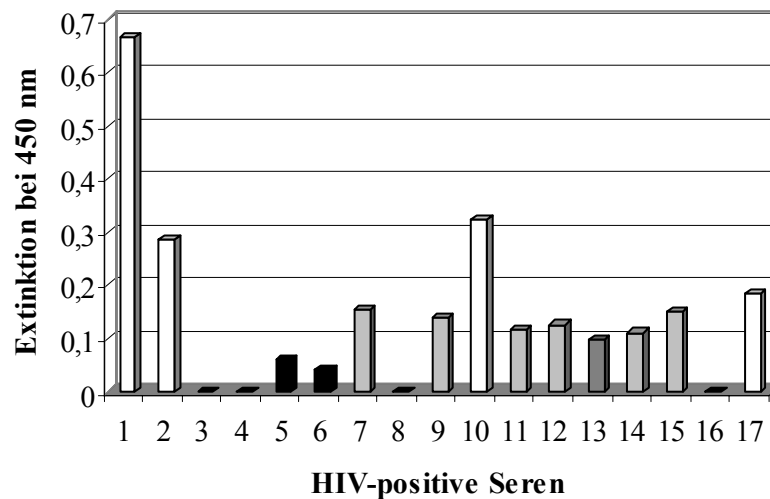


Abb. 30: ELISA ausgewählter HIV-1 positiver Seren zur Untersuchung auf Antikörper gegen Env362-420, Durchführung des ELISA mit optimierten Bedingungen (siehe 2.4.1), aufgeführte Werte der Seren sind Extinktionen abzüglich des Mittelwerts der HIV-1 negativen Seren (weiße Balken: ++, hellgrau: +, dunkelgrau: (+), schwarz: -)

3.9.7.1 Untersuchung der verwendeten Seren auf Antikörper gegen das Peptid Env362-420

Mit dem etablierten ELISA wurden die in den Transzytoseversuchen verwendeten Seren und Plasmen auf Antikörper gegen das Peptid untersucht. Eingesetzt wurden die Seren mit einer deutlichen Bande im Western Blot bei Antikörpern gegen gp120 aus Kapitel 3.6.1, die Seren der Langzeitinfizierten und die Plasmen der Serokonversion (siehe ebenfalls 3.6.1). In Abbildung 31 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass in den HIV-1 positiven Seren, die in den ersten Transzytoseversuchen (Kapitel 3.6.1) verwendet wurden, Antikörper vorhanden sind, die gegen Env362-420 gerichtet sind. Auch die Seren der Langzeitinfizierten (LTNP) zeigten eine deutliche Extinktion im Peptid-ELISA. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den Seren Langzeitinfizierter, ließen sich in den Plasmen der dokumentierten Serokonversion keine Antikörper gegen das Oligopeptid nachweisen.

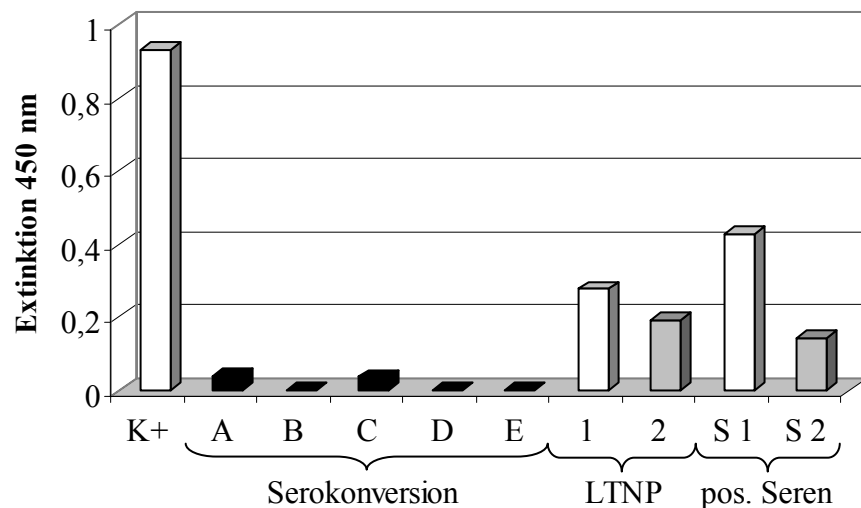


Abb. 31: Ergebnisse des Peptid-ELISAs mit in den Transzytoseversuchen verwendeten Seren: A bis E sind die Plasmen der dokumentierten Serokonversion in der Reihenfolge ihrer Abnahme, 1 bis 2 sind die Seren der Langzeitinfizierten, S1 und S2 Seren der ersten Transzytoseversuchen mit deutlich Antikörpertiter gegen gp120, K+ ist die Positivkontrolle, aufgeführte Werte sind Extinktionen abzüglich des Mittelwerts der HIV-1 negativen Seren: weiße Balken: ++, hellgrau: +, dunkelgrau: (+), schwarz: -

3.9.7.2 Untersuchung von Verlaufsseren auf Antikörpern gegen das Peptid Env362-420

Eine Ausbildung von Antikörpern gegen die in den Transport involvierte Domäne auf gp120 könnte einen positiven Verlauf auf die Prognose der Krankheit besitzen. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Seren von definierten Infektions- oder Krankheitsverläufen in den Peptid-ELISA eingesetzt. Die einzelnen Seren waren klinisch gut charakterisiert und jeweils einem Krankheitsbild zugeordnet. Es wurden pro Patient drei Seren eingesetzt. Ein Studienkollektiv beinhaltete Seren von Patienten, die über den gesamten Untersuchungszeitraum bereits an AIDS erkrankt waren, zwei weitere mit Seren von Patienten, die entweder in der Latenzphase oder in der LAS/ARC-Phase blieben und ein Studienkollektiv mit Patienten, die während der Untersuchung eine Stadienprogredienz durchmachten. In der Abbildung 32 sind die Ergebnisse des Peptid-ELISAs mit den beschriebenen Seren dargestellt. Bildet man die Mittelwerte der Antikörpertiter der vier Gruppen (schwarze gestrichelte Linien in Abbildung 32), sieht man, dass Patienten mit LAS/ARC im mittel die höchsten Antikörpertiter haben, gefolgt von den Patienten mit AIDS und Patienten in der Progression.

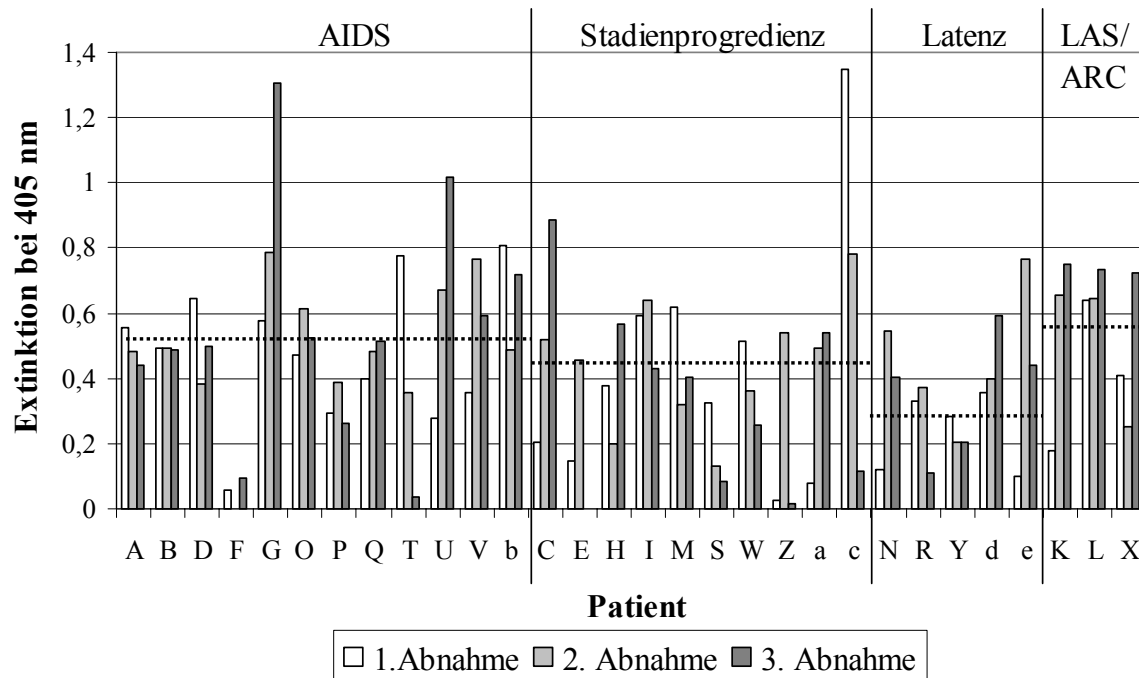


Abb. 32: Ergebnisse der Peptid-ELISAs mit Seren aus Krankheitsverläufen, schwarz gestrichelte Linie in den einzelnen Studienkollektiven stellt den Mittelwert aller in diesem Kollektiv ermittelten Extinktionen dar (A, B, C,... bedeutet jeweils ein Patient/Proband).

Die Patienten in der Latenzphase besaßen im Mittel die geringsten Antikörpertiter. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass bei einer bestehenden Infektion die Transzytose keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf besitzt. Vorstellbar wäre jedoch weiterhin ein Einfluss der Transzytose in der frühen Infektionsphase. Hier könnte durch eine frühe Expression der Antikörper die Ausbreitung von HIV-1 im Körper gehemmt werden. Leider ist der Infektionszeitpunkt bei den Patienten der verwendeten Verlaufsseren nicht bekannt, es sind aus dieser Phase keine Seren verfügbar. Untersuchungen von Seren dokumentierter Serokonversionen könnten Aufschluss über den Zeitpunkt der Antikörperbildung gegen diese Domäne geben. Längere Verläufe von diesen dokumentierten Serokonversionen mit möglichen unterschiedlichen Krankheitsverläufen gibt es leider nicht.

3.9.7.3 Untersuchung von dokumentierten Serokonversionen auf Antikörpern gegen das Peptid Env362-420

Zur Untersuchung, ob es Unterschiede in der Antikörperexpression gegenüber Env362-420 zu Beginn einer Infektion mit HIV-1 kommt, wurden Seren von sechs dokumentierten Serokonversionen untersucht. Eine Beantwortung der Frage, ob eine frühe Expression von Antikörpern gegen die in den Transport involvierte Domäne auf gp120 einen Einfluss auf die

Prognose der Krankheit besitzt, ist mit diesen Seren nicht möglich, da diese Seren nur in der Anfangsphase der Infektion gewonnen wurden und zudem die Patienten schon während der Serokonversion mit einer antiretroviralen Therapie begonnen haben. Bei den Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben, wurde zum frühest möglichen Zeitpunkt nach einem bekannten Infektionsrisiko mit der Serumabnahme begonnen. Diese Proben wurden in einer HIV-spezifischen PCR auf das Vorhandensein von HIV-RNA und in ELISAs bzw. Western Blots auf HIV-spezifische Antikörper untersucht (C. Kücherer, persönliche Mitteilung). Die Infektion wurde bei den ersten Proben entweder durch den Nachweis von HIV-spezifischer RNA im Serum oder durch HIV-spezifische Antikörper (siehe Tab. 32) nachgewiesen. Bei den Patienten a, d, e und f (Abb. 33) waren neben der HIV-spezifischen HIV-RNA zu diesem Zeitpunkt HIV-spezifische Antikörper sowohl in beiden HIV-ELISAs als auch im Western Blot detektierbar, bei Patient b waren Antikörper gegen HIV nur in einem ELISA (Bio-Rad) nachweisbar (Western Blot und Murex-ELISA negativ), bei Patient c gab es in beiden ELISAs eine fragliche Reaktion (Western Blot negativ). Nach dem Verlauf einer unbehandelten HIV-Infektion befanden sich die Patienten a, d, e und f zu Beginn der Probennahme am Übergang zur Phase III mit nachweisbarer HIV-RNA und beginnender Antikörper-Expression, d.h. ca. 4 bis 6 Wochen nach Infektion. Die Patienten b und c befanden sich bei der ersten Probennahme in der Phase II vor detektierbarer Antikörpermengemenge im Serum, d.h. zwischen 2 bis 4 Wochen nach dem Infektionsereignis. Den Patienten wurde nach dem Nachweis der HIV-Infektion über 16 bis maximal 28 Wochen in unterschiedlichen Anständen 6- bis 7-mal Blut abgenommen. Hier betrug der Mindestabstand zwischen zwei Abnahmen 2 Wochen und der maximale Abstand 8 Wochen. Die einzelnen Seren der Patienten wurden 1:100 verdünnt in den etablierten Peptid-ELISA eingesetzt. In der Abbildung 33 sind die Ergebnisse der ELISA-Testung dargestellt.

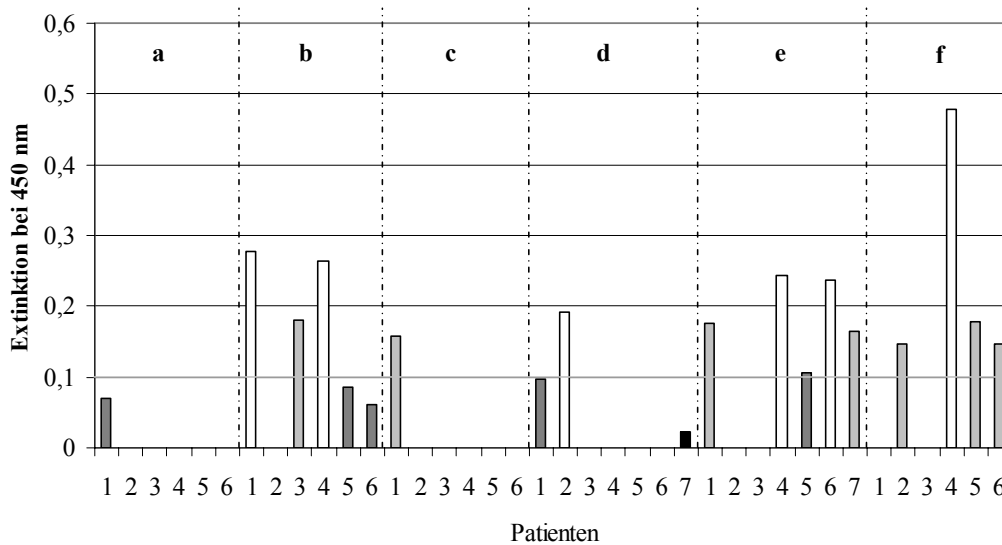


Abb. 33: Ergebnisse der Peptid-ELISAs mit Seren aus dokumentierten Serokonversionen, aufgeführte Werte der Seren sind Extinktionen abzüglich des Mittelwerts der HIV-1 negativen Seren: weiße Balken: ++, hellgrau: +, dunkelgrau: (+), schwarz: -

Es zeigte sich, dass Patient b, welcher zu Beginn der Probennahme noch in der frühen Infektionsphase war, Antikörpertiter gegen Env362-420 besitzt. Die Antikörpertiter nehmen jedoch zum Ende des Untersuchungszeitraumes ab. Dagegen verfügt Patient c, der sich zu Anfang in der ähnlichen Phase befand, nur in der ersten Abnahme über Antikörper gegen Env362-420. Bei den Patienten am Übergang zur Phase III besitzen die Patienten a und d keine oder nur geringe Antikörpertiter, während Patient e und f über deutliche Antikörpertiter verfügen. Es ist jedoch auffällig, dass bei den Patienten mit Antikörpern die Menge an messbaren Antikörpern schwankt. Bei jedem Verlauf sind Abnahmen ohne Antikörper zu finden.

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der Proben von dokumentierten Serokonversionen, dass zu Beginn der HIV-Infektion es unterschiedliche Antikörpertiter gegen das identifizierte Peptid gibt. Ein Einfluss durch Antikörper gegen die Domäne auf HIV-1, welche für die Überwindung von Barrieren innerhalb des Körpers und somit für die Ausbreitung verantwortlich sein könnte, auf die Prognose der Krankheit ist nach diesen Ergebnissen möglich.

3.9.8 Immunisierung von Kaninchen

Mit Immunseren gegen die identifizierte Domäne sollten nach den Versuchen mit den unterschiedlichen Subtypen sowie der Nachweise von Antikörpern gegen Env362-420 in Seren HIV-infizierter Individuen die Möglichkeit der Hemmung des Transportes durch Blockierung der in den Transport involvierten Domäne auf den verwendeten Viren untersucht werden. In Anlehnung an die Aminosäurevergleiche zwischen Env362-420 und den verwendeten Virusisolaten (Abb. 29) wurde ein zweites Peptid (Env362-420mod.) mit vier Aminosäureaustauschen zur Synthese und Kopplung an KLH in Auftrag gegeben. Die Abb. 34 zeigt die veränderte Aminosäuresequenz.

372
387
388
411
 Env362-420mod. KQSSGGDPEITTHSFNCGGEFFYCNTSQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTEGNDTITLPCRI

Abb. 34: Aminosäuresequenz von Env362-420mod. zur Immunisierung, Aminosäuren, die zur Sequenz des bisher verwendeten Peptids verändert wurden, sind grau hinterlegt.

Zwei Kaninchen wurden nach Abnahme der Präseren mit dem Peptid-KLH-Komplex immunisiert und die Seren nach der 1.Boosterung (Immunseren) sowie die Präseren für weitere Versuche verwendet. Zunächst wurde in einem modifizierten Peptid-ELISA die Reaktivität der Kaninchenseran gegen Env362-420mod. gemessen. Bei Tier 1 wurde ein Antikörpertiter von 1:128.000 und bei Tier 2 von 1:32.000 ermittelt. Die Präseren reagierten nicht. Zusätzlich wurden die Seren von Tier 1 auf eine Reaktivität gegenüber Env362-420 getestet. Hier lag der Antikörpertiter nur noch bei 1:8.000. Im Synzythien-Inhibierungsassay konnten weder in den Präseren noch in den Immunseren neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. In einem Immunfluoreszenztest (IFT) mit HIV-1_{III}B-infizierten Zellen wurde die Spezifität der Immunseren gegenüber viralem gp120 untersucht. Die Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenztests mit dem Präserum und dem Immunserum von Tier 1. Eine spezifische Bindung der Antikörper im Serum nach der Boosterung konnte bis zu einer Verdünnung von 1:100 gesehen werden. In den parallel durchgeführten Immunfluoreszenztesten mit dem Präserum konnte ab einer Verdünnung von 1:50 keine (unspezifische) Bindung mehr detektiert werden. Neben der Untersuchung der Seren im Immunfluoreszenztest wurde die Spezifität gegenüber viralem gp120 im Western Blot bestimmt. Hierzu wurde aus virushaltigem Zellkulturüberstand HIV durch Ultrazentrifugation pelletiert, die viralen Proteine über ein SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In diesem Test konnte nur bis zu einer Verdünnung der

Immunseren von 1:10 bis 1:50 eine Bande in der Größe von gp120 gesehen werden. Hier scheint eine geringere Sensitivität vorzuliegen, welche in der Menge an transferiertem Protein auf die Nitrozellulosemembran begründet sein kann.

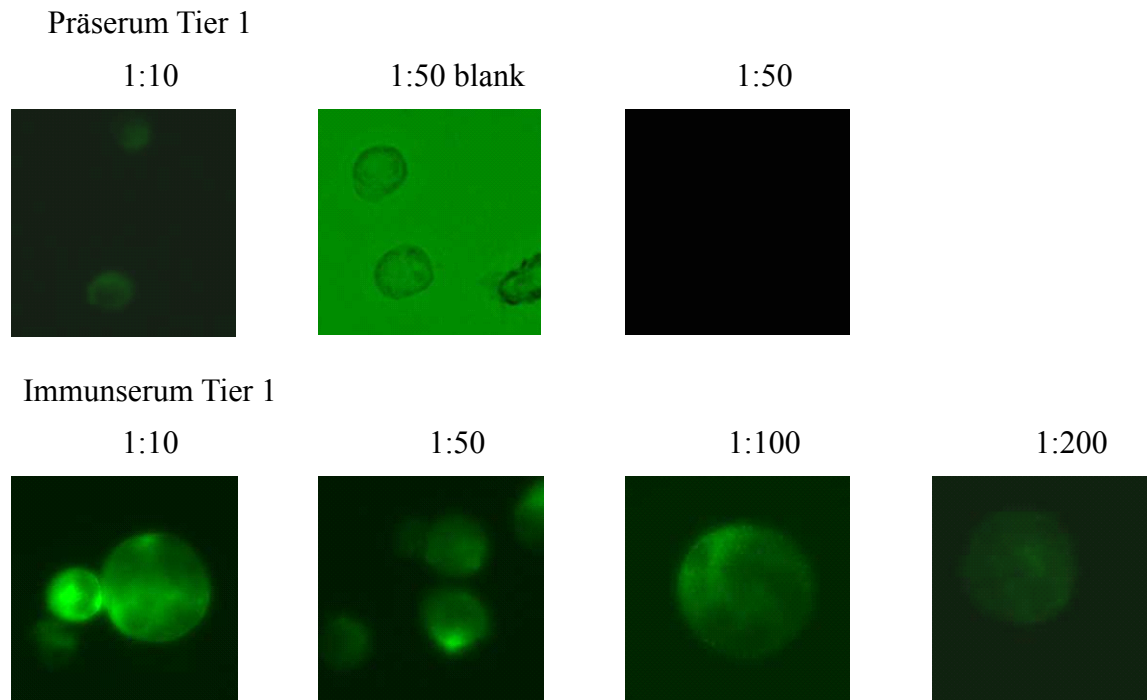


Abb. 35: Ergebnisse des Immunfluoreszenztest mit Präserum und Immunserum aus Tier 1

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Präseren und Immunseren sind in der Tabelle 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Charakterisierung der Immunseren.

	Tier 1		Tier 2	
	Präserum	Immunserum	Präserum	Immunserum
Peptid (Env362-420mod)-ELISA	0	1:128.000	0	1:32.000
Peptid (Env362-420)-ELISA	nb	1:8.000	nb	nb
neutralisierende Antikörper	—	—	—	—
Western Blot	—	1:10-1:50	—	1:10
Immunfluoreszenztest	—	1:100	—	1:100

Untersuchung der Spezifität der Immunseren im Peptid-ELISA gegen die verwendeten Peptide, im Western Blot und in der Immunfluoreszenz gegen virales gp120, Untersuchung auf neutralisierende Antikörper im Synzythien-Inhibierungsassay (SIA), nb = nicht bestimmt.

Bei der Charakterisierung der Immunseren im Western Blot und mit dem Immunfluoreszenztest wird deutlich, dass die hohen Antikörpertiter im Peptid-ELISA sich nicht in einer hohen Bindungskapazität an viralem gp120 widerspiegeln. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Seren in die folgenden Transzytoseversuche 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt. In diesen Konzentrationen ist eine Bindung der Peptid-spezifischen Antikörper an viralem gp120 nachweisbar.

Zur Untersuchung der Inhibierung der Transzytose wurden vor Beginn die Viren entweder mit 1:10 oder 1:100 verdünnten Kaninchenseren in D-MEM für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Bindung der Antikörper an die für die Transzytose essentielle Domäne zu ermöglichen. Zur Auswertung wurde die Menge an transportierten Viren – gemessen mit der TaqMan™-PCR – in den Versuchen nach Vorinkubation der Viren mit dem jeweiligen Präserum als 100% gewertet und die Menge in den Versuchen mit den Immunseren darauf bezogen. In der Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt.

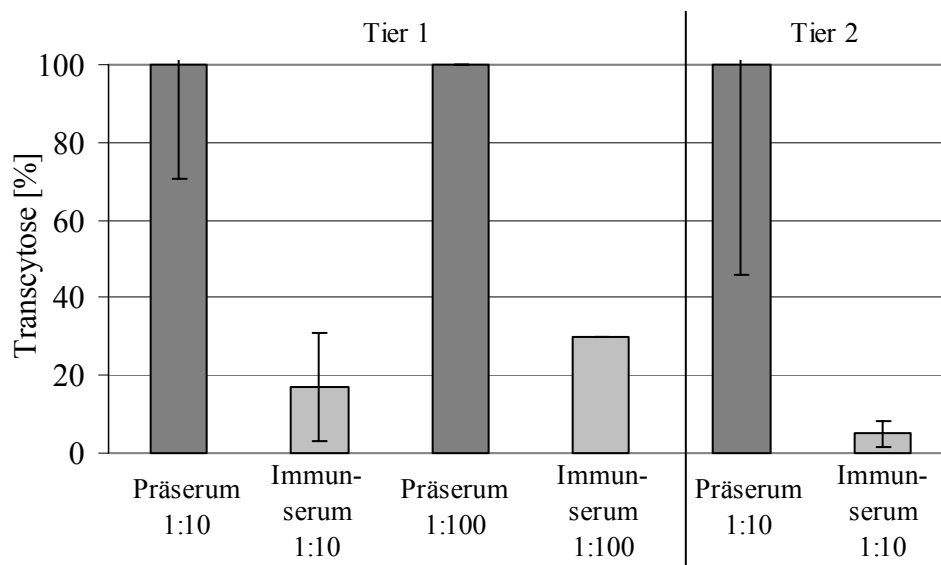


Abb. 36: Transzytose HIV-1_{IIB} durch FL-Zellen nach Inkubation der Viren mit Präserum und Immunserum, die Seren wurden 1:10 (Tier 1 und 2) bzw. 1:100 (Tier 1) verdünnt in die Versuche eingesetzt, Angabe der Standardabweichung bei Tier 1 1:100-Verdünnung nicht möglich, da nur zwei auswertbare Versuche vorlagen. Angabe von Mittelwerten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

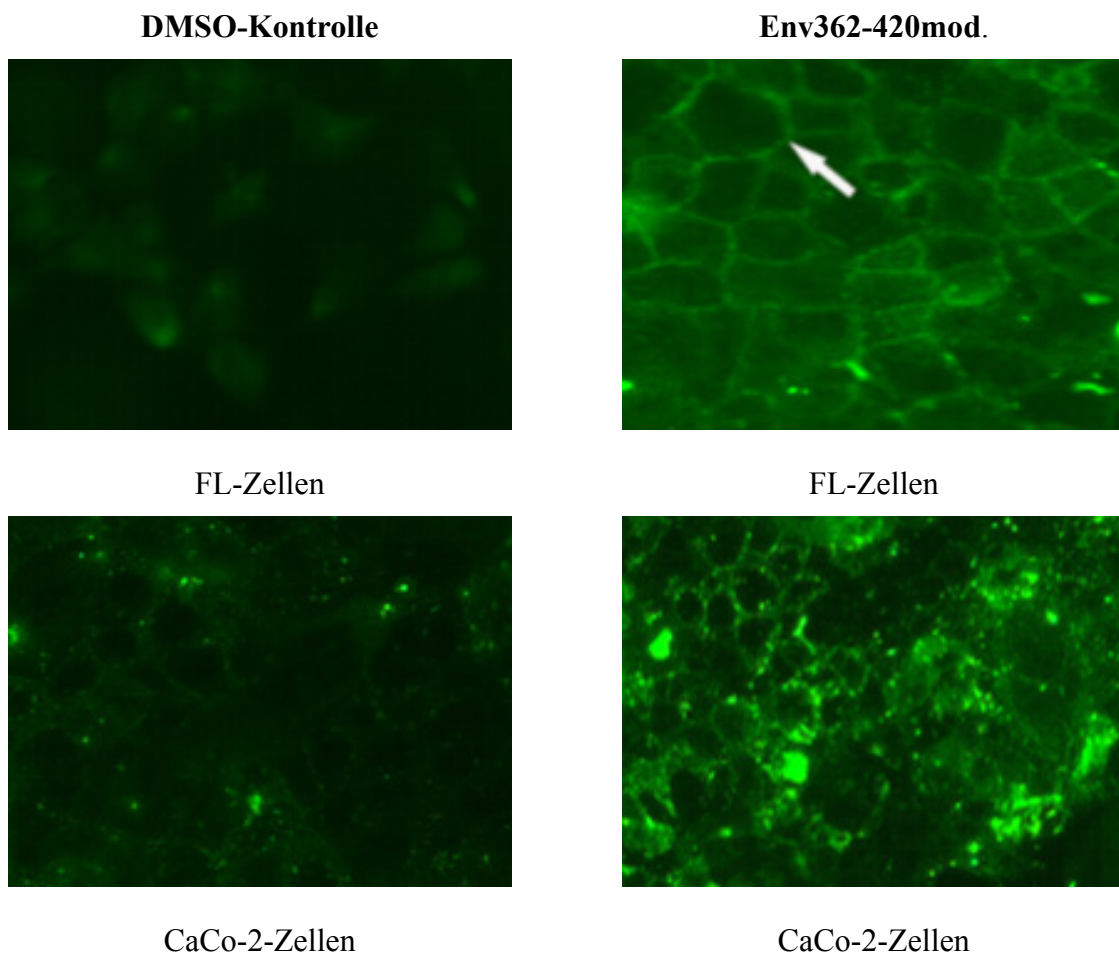
Nach Vorinkubation der Viren mit dem Immunserum wurde bei einer Serumkonzentration im Ansatz von 10% die Transzytose von HIV-1_{IIB} durch FL-Zellen auf $17 \pm 14\%$ bei Tier 1 und auf $5 \pm 3\%$ bei Tier 2 in Vergleich zum Kontrollversuch mit Präserum reduziert, bei einer Serumkonzentration von 1% im Ansatz auf 30%. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern,

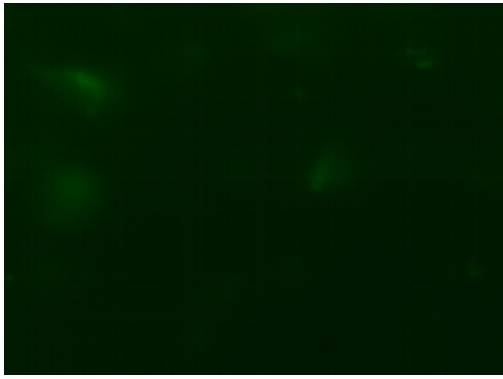
dass eine Bindung der Antikörper an die in den Transport involvierte Domäne auf gp120 der eingesetzten Viren den Transport der Viren durch FL-Zellen inhibiert. Dies bestärkt die Annahme, dass Antikörper gegen die identifizierte Domäne in Seren HIV-infizierter Individuen für die Hemmung der Transzytose verantwortlich sind und somit Antikörper gegen das Peptid mögliche Inhibitoren der Transzytose von HIV-1 durch Epithelien darstellen.

3.9.9 Nachweis der Bindung von Env362-420mod. an epitheliale Zellen

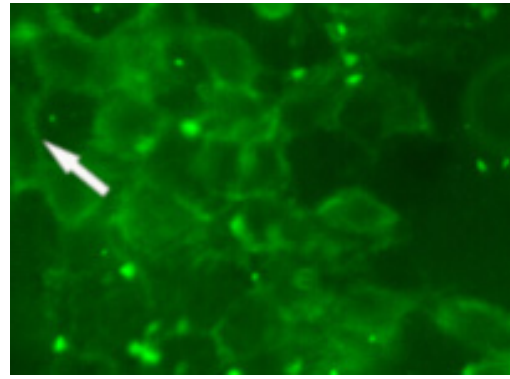
Nach Generierung von Antikörpern gegen Env362-420mod. war es möglich die Bindung von Env362-420mod. an epitheliale Zellen nachzuweisen. Neben den FL- und CaCo-2-Zellen wurden noch Hela-Zellen (humanes Cervixkarzinom) und HT19/B6-Zellen (humanes colorektales Adenokarzinom) eingesetzt. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 24: Nachweis der Bindung von Env362-420mod. an epitheliale Zellen.

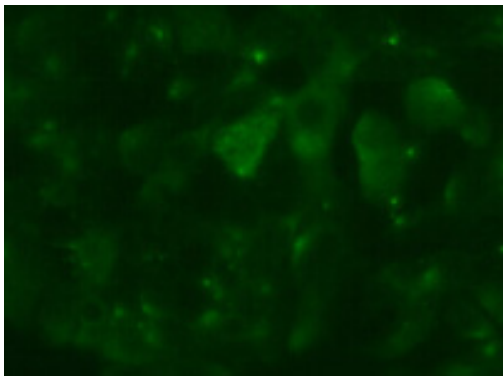




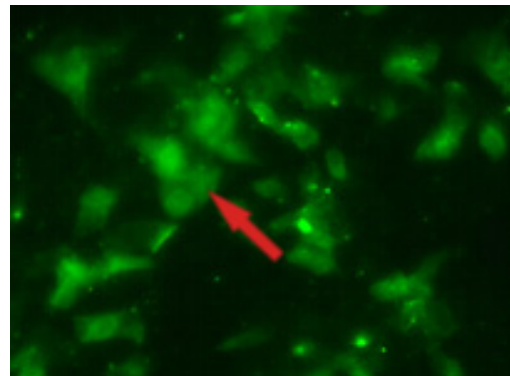
Hela-Zellen



Hela-Zellen



HT29/B6-Zellen



HT29/B6-Zellen

Dargestellt sind zu jeder Zelllinie die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung nach Inkubation mit DMSO (Kontrolle) und Env362-420mod., Pfeile deuten die Lokalisierung des gebundenen Peptids auf der jeweiligen Epithelzelle an.

Während die Kontrollansätze, die nur mit DMSO inkubiert wurden, eine schwache Fluoreszenz zeigen, ist die Fluoreszenz bei den Ansätzen mit der Inkubation mit Env362-420mod. bei allen eingesetzten Zellen sehr deutlich zu sehen. Bei FL-, Hela- und CaCo-2-Zellen sieht man, dass der Rezeptor für Env362-420mod. an den Zellverbindungen (tight junctions) lokalisiert ist (Tab. 24, weiße Pfeile). Bei den HT29/B6-Zellen sieht man eine Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle (Tab. 24, roter Pfeil). Der Env362-420mod.-bindende Rezeptor ist auf allen untersuchten Epithelzellen vorhanden. Da die Transzytose durch FL- als auch CaCo-2-Zellen in Anwesenheit von Env362-420 inhibiert werden kann, kann man postulieren, dass der Transport durch Hela- und HT29/B6-Zellen ebenfalls mit dem Peptid inhibierbar ist.

3.9.10 Untersuchung der Transzytose von HIV-1_{IIIB} im Eihautmodell

Die Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch FL-Zellen lässt sich nach Vorinkubation der Viren mit den Immunseren aus Kapitel 3.8.8 inhibieren. Zur Übertragung dieser Ergebnisse auf komplexe Gewebe, wurde der Transport von HIV-1_{IIIB} auch in einem Eihautmodell

untersucht. Hierzu wurde die Eihaut kurz nach der Geburt wie im Methodenteil unter Kapitel 2.3.4 beschrieben präpariert und für die Transzytoseversuche auf Filtereinheiten in einer 6-Loch-Platte gesetzt. Der Virusstock wurde vor Start der Transzytose entweder in 1:10 oder 1:100 verdünnten Kaninchenserum für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Start der Transzytose erfolgte nach Überführung der Virus-Kaninchenserum-Mischung in das obere Kompartiment des Versuchsmodells. Es wurden jeweils die Präseren als auch die Immunseren in die Versuche eingesetzt. Die Menge an transportierten Viren nach 3 und 24 Stunden im unteren Kompartiment wurde mittels TaqManTM-PCR nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese bestimmt. In den durchgeführten Versuchen mit Eihäuten unterschiedlicher Spenderinnen, sowie von Spontangeburt und Kaiserschnitten konnte durch Vorinkubation der Viren mit den Kaninchenserum keine Reduktion des Transportes von HIV-1_{IIIB} im Vergleich zu den Versuchen mit den Präseren gesehen werden. Eine Übertragung der Ergebnisse im Modellsystem mit FL-Zellen auf komplexe Gewebe scheint zu unterschiedlichen Ergebnissen zu führen.

4 Diskussion

Zu den Hauptübertragungswegen einer HIV-Infektion zählt neben ungeschütztem Geschlechtsverkehr und Einbringen von erregerhaltigem Blut beim gemeinsamen Spritzengebrauch von i.v. Drogenkonsumenten die prä-, peri- oder postnatale Übertragung von der Mutter auf das Kind. Bei einer HIV-Infektion des Kindes ist die Infektion in utero oder bei der Geburt als der Hauptinfektionsweg anzusehen. Man geht davon aus, dass etwa 25% der Neugeborenen von HIV-infizierten Müttern in den Entwicklungsländern bei der Geburt infiziert werden. In Deutschland und in anderen europäischen Staaten war es möglich durch Präventionsmaßnahmen, wie eine antiretrovirale Therapie während der Schwangerschaft, einer primären Sectio vor Einsetzen der ersten Wehen und einem Verzicht auf das Stillen des Neugeborenen, die Zahl der prä-, peri- und postnatalen Übertragungen durch HIV-infizierte Mütter auf unter 1% zu reduzieren. Jedoch sind die Gesundheitsrisiken bzw. Langzeitschäden des Kindes aufgrund der antiretroviralen Therapie während der Schwangerschaft und nach der Geburt noch nicht abzuschätzen. Die Durchführung der Präventionsmaßnahmen in den Entwicklungsländern, in denen 95% der weltweit HIV-Infizierten leben, ist insbesondere aufgrund der hohen Kosten und der unzureichend ausgebauten Gesundheitswesen nur bedingt möglich. Hier stellte sich die Strategie der einmaligen Gabe von Nevirapine – ein Nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptasehemmer – intrapartum als effektive Prophylaxe heraus [Guay *et al.* 1999]. Ein Nachteil dieser Strategie ist das Auftreten von Nevirapine-Resistenzen, die sich aufgrund der langen Halbwertszeit des Medikaments schon nach einer einmaligen Gabe ausbilden können [Eshleman *et al.* 2005, Flys *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2005]. In klinisch-epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Infektion bei der Mehrzahl der HIV-infizierten Kinder kurz vor der Geburt liegen muss. Der Mechanismus der perinatalen Infektion des Kindes ist jedoch bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird postuliert, dass lokal produzierte HIV-Viren aktiv durch die Eihaut transportiert werden, ins Fruchtwasser gelangen und wiederum durch einen aktiven Transport durch die Epithelzellen der Atemwege oder des Magen-Darm-Traktes das Kind infizieren können. Die Identifizierung der Domäne auf gp120 von HIV-1, welche den Transport durch die Epithelien initiieren kann, und die auf diesen Ergebnissen aufbauende Entwicklung eines Inhibitors wäre zur Senkung der Transmissionsrate insbesondere in den Entwicklungsländern wünschenswert. In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe eines Zwei-Kompartiment-Systems mit Amnion-Zellen

als Modell für den Transport von HIV-1 durch die Eihaut als initialer Schritt der Mutter-Kind-Übertragung die in den Transport involvierte Domäne auf gp120 identifiziert werden.

4.1 Inhibition des Transportes durch mono- und polyklonale Antikörper

Zu Beginn dieser Arbeit standen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Morgane Bomsel bezüglich des Transportes von zellfreien HI-Viren durch Epithelzellen den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe gegenüber. In dem Modellsystem mit intestinalen Epithelzellen von Bomsel und Kollegen konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe kein effizienter Transport von zellfreien HIV nachgewiesen werden [Hocini *et al.* 1999]. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse wäre die Anwesenheit von relativ hohen Konzentrationen an fötalem Kälberserum (FKS) im Versuchsansatz der anderen Arbeitsgruppe. Kage und Kollegen konnten in ihren Versuchen zeigen, dass Bestandteile im FKS den Transport von zellfreien Viren inhibieren [Kage *et al.* 1998]. Zudem diskutieren Bomsel und Kollegen die Beteiligung einer bestimmten Aminosäuresequenz auf gp41 am Transport von zell-assoziierten HIV durch Epithelzellen. Durch Zugabe von polyklonalen Antikörpern aus HIV-positiven Seren bzw. des monoklonalen Antikörpers 2F5, welche die Aminosäuresequenz ELDKWA auf gp41 erkennen, konnte die Transzytose inhibiert werden [Alfsen *et al.* 2001, Bomsel *et al.* 1998]. Gemessen wurde dabei die Menge an infektiösen Viren, die transportiert wurde. Nach unseren Ergebnissen ist für die Initialisierung des Transportes von HIV-1 die Bindung von gp120 an einen bislang unbekannten Rezeptor auf der Epithelzelle verantwortlich [Kage *et al.* 1998]. Aufgrund dieser Diskrepanzen in den Untersuchungsergebnissen, sollte der Einfluss des Antikörpers 2F5 auf den Transport von HIV in unserem Modellsystem untersucht werden, wobei eine Reduktion der Transportrate in Anwesenheit des Antikörpers 2F5 nicht erwartet wurde. Um erste Hinweise auf das in den Transport von HIV-1_{IIIB} involvierte Epitop auf gp120 zu bekommen, wurden zusätzlich Versuche zur Inhibierung der Transzytose mit dem monoklonalen Antikörper 2G12, welcher ein Epitop auf gp120 erkennt, durchgeführt. Vor Durchführung der Transzytoseversuche wurde in Synzythien-Inhibierungsassays die neutralisierende Wirkung der Antikörper auf die beiden zur Verfügung stehenden Laborisolate HIV-1_{IIIB} (Isolat LAI Acc. Nr. K02013) und HIV-1 Gruppe O (Isolat MP5180, Acc. Nr. L20571) untersucht. Diese Untersuchungen waren notwendig, um sicher zu gehen, dass der jeweilige Antikörper an das Virusisolat binden und somit einen Einfluss auf die Transzytose haben kann. HIV-1_{IIIB} wurde von beiden Antikörpern wie in der Literatur beschrieben neutralisiert. Das von 2F5 erkannte Epitop ist konserviert. Die Glykosylierungsstellen auf gp120, die das Epitop von 2G12 bilden, sind für

das Laborisolat HIV-1_{IIIB} LAI beschrieben [Sanders *et al.* 2002]. Das Isolat HIV-1 Gruppe O konnte weder durch 2F5 noch durch 2G12 neutralisiert werden. Für 2F5 ist beschrieben, dass schon ein Aminosäureaustausch in der sensitiven Aminosäuresequenz LDKW zu einer Resistenz gegenüber dem Antikörper führt. In der Sequenz des O-Isolats kommt es in diesem Motiv zu einem Austausch von K zu E und somit zu einem Verlust der neutralisierenden Wirkung des Antikörpers [Purtscher *et al.* 1996]. Vergleicht man die Aminosäuresequenz des HIV-1 Gruppe O Isolats mit der Sequenz von HIV-1_{IIIB} LAI in der Region der Bindungsstelle von 2G12 (Abb. 37), sieht man an den Positionen 295, 332 und 339 einen Aminosäureaustausch von N zu T (295 und 332) und von N zu E (339). Die an diesen Asparaginen gebundenen Mannosereste sind für die Bindung und der daraus resultierenden Neutralisierung durch 2G12 erforderlich. Virusisolate mit nur einem Aminosäureaustausch an diesen Stellen, was zu einem Verlust der Glykosylierungsstelle führt, sind weniger gut durch 2G12 zu neutralisieren [Scalan *et al.* 2002]. Das verwendete HIV-1 Gruppe O Isolat, welches drei der fünf Glykosylierungsstellen nicht besitzt, ist gegenüber 2G12 resistent.

		295		332
HIV-1 _{IIIB} LAI	TDNAKTIIVQLNQSV	IN	CTRPNNNTRKSIRIQ	RGPGR-AFVTIGKIGNM---RQAH
HIV-1 MP5180	TESAKNLIIVTLNTP	IN	MT	CIR--EGIAEVQDIYTGPMRWRSMTLKR
		339		386
HIV-1 _{IIIB} LAI	ISRAKWNATLKQI	ASKLREQFGN--	NKTII	IFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFF
HIV-1 MP5180	YNKTVWENALQQ	TAIRYLN	LVNQ	TENVTIIFSR
		392		
HIV-1 _{IIIB} LAI	FN	STW	FN	
HIV-1 MP5180	FN	YTF	FIN	

Abb. 37: Aminosäurevergleich zwischen HIV-1_{IIIB} LAI und HIV-1 Gruppe O (Isolat MP5180) im Bereich des Epitops von 2G12 auf gp120, die Glyko-Seitenketten an den Positionen 295, 332, 339, 386 und 392 stellen das Epitop von 2G12 dar.

Die Inhibierungsversuche der Transzytose in Anwesenheit von 2F5 und 2G12 wurde nach diesen Ergebnissen ausschließlich mit HIV-1_{IIIB} LAI untersucht. Bei der Durchführung der Transzytose mit einer Vorinkubation der jeweiligen Antikörper mit Virus konnte in Anwesenheit von 2G12 keine Reduktion des Partikeltransportes, gemessen mit der TaqMan™-PCR, beobachtet werden. Wurde jedoch in der gleichen Probe die Menge an infektiösen Viren bestimmt, so konnte hier im Vergleich zur Kontrolle nur $34 \pm 18\%$ der Menge an infektiösen Viren nachgewiesen werden. Dieser Unterschied kann wie folgt erklärt werden: Während der Inkubation der Viren mit dem Antikörper kam es zu einer Bindung des Antikörpers an das Virus. Der gebundene Antikörper blockierte dabei jedoch nicht die Bindungsstelle auf gp120, die an den zellulären Rezeptor bindet und die Transzytose initiiert. Es wurden mit 2G12 beladene und somit neutralisierte Viren durch die Epithelzellen

transportiert (siehe Abb. 38b). Das von dem Antikörper erkannte Epitop auf gp120 hat somit keinen Einfluss auf die Transzytose. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit 2F5 erzielt. Hier konnten im Vergleich zur Kontrolle $86 \pm 21\%$ an transportierten HIV-Partikeln im unteren Kompartiment und in der gleichen Probe $52 \pm 26\%$ infektiöse Viren nachgewiesen werden. Wurden die Versuche mit einer Vorinkubation der FL-Zellen mit den jeweiligen Antikörpern durchgeführt, konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine signifikante Reduktion der Transportrate in beiden Ansätzen festgestellt werden. Eine Reduktion des Partikeltransportes konnte auch hier nur in den Ansätzen mit 2F5 beobachtet werden ($78 \pm 16\%$), jedoch ist diese Hemmung nicht als spezifisch anzusehen. Immunglobuline der Klasse G tragen an jedem F_c -Teil ein kovalent gebundenes Oligosaccharid. Die N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide von IgG bestehen aus vier N-Acetylglucosamin- und drei Mannose-Resten sowie je einem Fucose- und Galaktose-Rest. In der Arbeit von Kage [Kage *et al.* 1998] konnte gezeigt werden, dass Oligosaccharide in der Lage sind, die Bindung von HIV-1 an den zellulären Rezeptor zu verhindern. Die Zuckerreste der eingesetzten Antikörper könnten ebenfalls durch Bindung an die Lektin-Domäne auf gp120 die Transzytose in den durchgeführten Versuchen hemmen. Diese Annahme konnte in Versuchen mit deglykosylierten Antikörpern bestätigt werden. In Transzytoseversuchen mit deglykosylierten 2F5 und 2G12 konnte keine Reduktion des Partikeltransportes nach einer Vorinkubation der Zellen mit den Antikörpern festgestellt werden. Die deglykosylierten Antikörper wurden im Synzythien-Inhibierungsassay auf ihre neutralisierende Aktivität gegenüber HIV-1_{IIIB} untersucht. Die neutralisierende Wirkung war auch nach Entfernung der Oligosaccharide weiterhin vorhanden. Die reduzierte Menge an infektiösen Viren im unteren Kompartiment kann durch den Transport Antikörper gebundener Viren erklärt werden. Die Annahme eines Transportes der Immunglobuline durch die Epithelzellen als Erklärung der Ergebnisse kann weitgehend ausgeschlossen werden. Der Transport von Immunglobulinen durch epitheliale Zellen ist nur bei Immunglobulinen der Klasse A und M beschrieben. Ausschließlich Antikörper dieser Klassen verfügen über eine J-Kette, welche an die spezifischen Rezeptoren auf den epithelialen Zellen binden und somit den aktiven Transport initiieren können. Ein weiterer Ort des Immunglobulin-Transports ist die Plazenta. Hier werden IgG-Immunglobuline der Unterklassen 2 und 4 über die F_c -Rezeptoren der Plazenta transportiert, ein Transport von Immunglobulinen durch die Eihaut ist bisher nicht beschrieben. Die in den Versuchen verwendeten Antikörper sind IgG-Immunglobuline der Unterklasse 1, die weder durch Epithelzellen noch durch die Plazenta transportiert werden. Aufgrund dieser Tatsache und der vorliegenden Ergebnisse muss man annehmen, dass mit den verwendeten

monoklonalen Antikörpern beladene und dadurch neutralisierte Viren durch die Epithelzellen transportiert wurden.

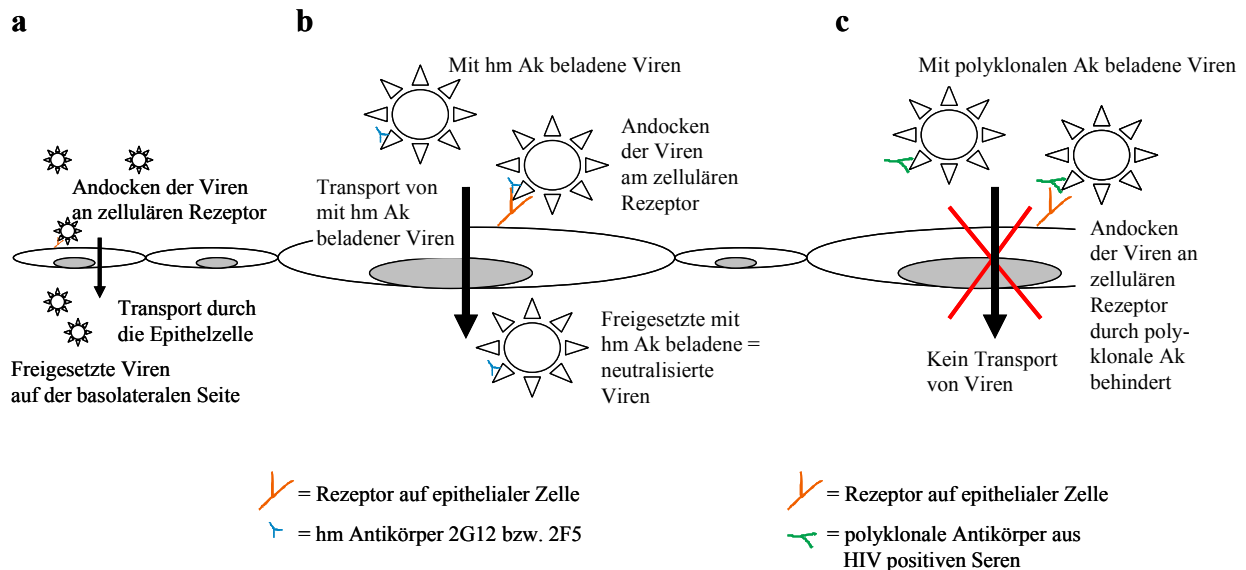


Abb. 38: Modell des HIV-Transports in Anwesenheit von humanen monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörpern: a Darstellung des Transports in Abwesenheit von Antikörpern, b Darstellung des Transports in Anwesenheit der monoklonalen Antikörper 2F5 oder 2G12, c Darstellung der Inhibition des Transports in Anwesenheit von humanen polyklonalen Antikörpern aus Serum HIV-infizierter Probanden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich des mAk 2F5 bei der Inhibition der Transzytose stehen – wie die Ergebnisse zum Transport von zellfreien Viren – den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Morgane Bomsel entgegen. Das Epitop ELDKWA, welches von 2F5 erkannt wird, spielt nach den hier gewonnenen Erkenntnissen keine Rolle bei der Transzytose von HIV-1. Der von Bomsel und Mitarbeitern beschriebenen Inhibitionen des Transportes von zell-assoziierten HI-Viren durch epitheliale Zellen durch 2F5 scheinen andere Mechanismen zugrunde zu liegen. Im von Morgane Bomsel entwickelten Arbeitsmodell zum Transport von zell-assoziierten HIV-1 durch die intakte Mucosa kommt es nach Kontakt der HIV-infizierten Zellen mit den Zellen der Mucosa zu einem Ausschütten der Viren in Richtung der Mucosa [Bomsel 1997]. Die epithelialen Zellen der Mucosa nehmen die freien Viren auf, transportieren diese durch die Zelle und schleusen sie auf der serosalen Seite wieder aus. Eine Inhibition des Virusbuddings durch die 2F5-Antikörper werden von Bomsel und Arbeitskollegen ausgeschlossen, wobei weder die Durchführung der Untersuchungen zum Virusbudding in An- und Abwesenheit des Antikörpers noch die Ergebnisse dazu in den Veröffentlichungen dargestellt wurden. Die

Inhibierung der Virusausschleusung durch 2F5-Antikörper könnte durch eine Bindung der Antikörper an virale Proteine auf der Oberfläche der HIV-infizierten Zellen ermöglicht werden. Aufgrund einer Kreuzvernetzung der Epitope durch die Antikörper wird das Ausschleusen der Viren verhindert bzw. die Viren auf der Oberfläche der Zellen fixiert und somit ein reduzierter Transport durch die epithelialen Zellen gemessen. In anderen Virus-Zell-Systemen wurde gezeigt, dass Antikörper gegen bestimmte virale Epitope die Freisetzung von Viruspartikeln inhibieren können. So inhibieren Anti-Neuraminidase-Antikörper die Freisetzung von Influenzaviren aus der infizierten Zellkultur, indem die viralen Oberflächenproteine auf der Wirtszelloberfläche – hier die Neuraminidase – über die Antikörper vernetzt werden [Compans *et al.* 1969]. Bomsel und Kollegen diskutieren die Unterschiede im Transport von HIV aus infizierten Zellen und zellfreien Viren mit der Zusammensetzung der Virusmembran nach Ausschleusen der Viren initiiert durch den Kontakt mit epithelialen Zellen [Bomsel 1997]. Nimmt man diese Hypothese an, können so auch die Unterschiede in den Ergebnissen der Inhibierung der Transzytose durch 2F5-Antikörper erklärt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Virusmembran könnte der Transzytose von zellfreien Viren anderen Mechanismen zugrunde liegen und damit verbunden andere Rezeptoren auf der epithelialen Zelle an der Transzytose beteiligt sein als bei „zell-assoziierten“ HIV.

Während der hier vorgelegten Untersuchungen mit den beiden monoklonalen Antikörpern wurde auch von der Arbeitsgruppe, die uns die Antikörper zur Verfügung gestellt hat, der Transport von zell-assoziierten HI-Viren durch intestinale Epithelzellen in Anwesenheit von 2F5 und 2G12 untersucht [Wolbank *et al.* 2003]. Bezüglich der Inhibierung des Transportes durch 2F5IgG stimmen die Ergebnisse mit unseren überein, obwohl hier – wie auch bei Bomsel und Kollegen – zell-assoziierte Viren verwendet wurden. Die in der Publikation beschriebene Reduktion des Transportes durch 2F5IgM und IgA lässt sich durch die Kreuzvernetzung der viralen Proteine auf der Oberfläche infizierter Zellen durch Antikörper erklären. Da dimere bzw. pentamere Antikörper zu einer stärkeren Kreuzvernetzung führen, kann damit der Unterschied zur Inhibierung durch IgG-Antikörper erklärt werden. Mit dem monoklonalen Antikörper 2G12 konnte die Arbeitsgruppe ähnliche Effekte sehen, die auf dem gleichen Mechanismus wie bei 2F5 beruhen. In der Veröffentlichung wurden jedoch keine Untersuchung zur Virusausschleusung in An- und Abwesenheit der jeweiligen Antikörper gezeigt. Eine Beteiligung der Epitope auf den Glykoproteinen, die durch die

beiden monoklonalen Antikörper erkannt werden, in den Transport von HIV durch epitheliale Zellen lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.

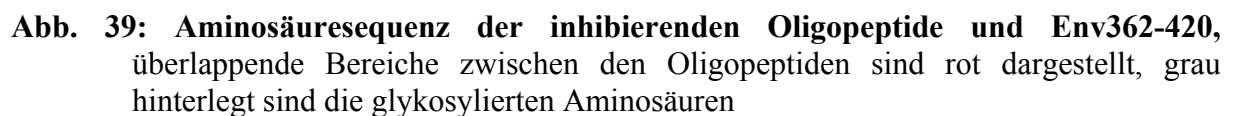
Da die Beteiligung definierter neutralisierender Antikörper an der Inhibition der Transzytose durch die vorgelegten Untersuchungen ausgeschlossen wurde, stellte sich die Frage, ob im Serum HIV-1 infizierter Individuen polyklonale Antikörper vorhanden sind, die den Transport von zellfreien Viren im verwendeten Modellsystem mit FL-Zellen hemmen können. Es konnte eine signifikante Reduktion des Transportes von HIV-Partikeln und infektiösen Viren durch bestimmte HIV-positive Seren nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass HIV-1 infizierte Patienten Antikörper besitzen, die gegen die in der Transzytose involvierte Domäne gerichtet sind. Während der Vorinkubation von HIV-positiven Serum und Virus kommt es zu einer Bindung von spezifischen Antikörpern aus dem Serum an die in den Transport involvierte Domäne auf gp120. Durch diese spezifische Bindung der Antikörper ist die Wechselwirkung zwischen HIV und dem spezifischen Rezeptor auf der Epithelzelle unterbunden, HIV wird nicht von der Zelle aufgenommen und transportiert (siehe Abb. 38c). Aufgrund der Lektineigenschaft der Domäne auf gp120 ist auch eine Bindung von Glykoseitenketten unspezifischer Antikörper aus HIV-positiven als auch HIV-negativen Seren möglich. Der Nachweis einer solchen Beeinflussung der Transzytose ist bereits im Zusammenhang mit deglykosylierten und nicht-deglykosylierten monoklonalen Antikörpern beschrieben worden und dient als Erklärung für die Reduktion des Transportes von HIV-1 in Anwesenheit von HIV-negativen Seren im Vergleich zur Kontrolle ohne Serum. Die Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Broliden und Kollegen [Broliden *et al.* 2001]. In dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Transzytose von HIV-1 durch intestinale Zellen (CaCo-2) durch aufgereinigte HIV-spezifische IgA-Immunglobuline inhibiert werden kann. Die Immunglobuline wurden aus dem Genitalsekret, Speichel und Plasma von so genannten HEPS (Highly Exposed, Persistently Seronegative) Personen aufgereinigt. Bei diesem Kollektiv handelt es sich um Personen, die häufigen ungeschützten Geschlechtsverkehr mit HIV-positiven Individuen hatten, zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht serokonvertiert waren, ein Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen HIV in den untersuchten Körperflüssigkeiten jedoch möglich war. Eine Reihe weiterer Arbeitsgruppen haben die Inhibition der Transzytose von zell-assoziierten HIV durch intestinale Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Immunglobulinen, aufgereinigt aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten HIV-infizierter Individuen, untersucht [Alfsen *et al.* 2001, Bélec *et al.* 2001, Becquart *et al.* 2000, Devito *et al.* 2000, Hocini *et al.*

1999, Bomsel *et al.* 1998, Hocini *et al.* 1997]. Auch in diesen Arbeiten konnte der Transport von zell-assoziierten HIV-1 durch spezifische Antikörper der Immunglobulinklassen G, M und A inhibiert werden. Ob – wie oben bereits erwähnt - jedoch der Mechanismus der Inhibierung des Transportes von zell-assoziierten Viren vergleichbar ist mit der Inhibierung des Transportes von zellfreien Viren, ist nicht geklärt. Der Transport von zell-assoziierten Viren kann, wie bereits oben diskutiert, neben der eigentlichen Inhibierung des Transportmechanismus auch durch Antikörper bewirkt werden, die das Ausschleusen der Viren aus den infizierten Zellen und dort deren Freisetzung verhindern.

4.2 Identifizierung der in den Transport involvierten Domäne auf gp120

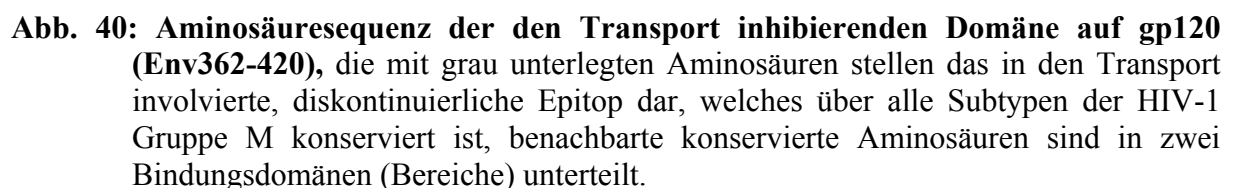
Durch Inhibitionsversuche mit Oligopeptidpools bzw. mit einzelnen Oligopeptiden konnte die Aminosäuresequenz auf gp120 identifiziert werden, die an dem Transport von HIV-1 durch Amnion-Zellen beteiligt ist. Dabei wird durch Vorinkubation der Zellen mit den inhibierenden Oligopeptiden bzw. dem auf der identifizierten Aminosäuresequenz basierenden Peptids Env362-420 die Bindungsstellen auf dem bisher noch nicht charakterisierten Rezeptor der epithelialen Zellen durch die Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor für eine konkurrierende Bindung von HIV-1 blockiert. Das Peptid repräsentiert die Aminosäuresequenz auf gp120, über die die Interaktion zwischen Virus und zellulären Rezeptor stattfindet. Diese Aminosäuresequenz beginnt mit AS 362 auf der C3-Domäne, reicht über die variable V4-Domäne und endet mit AS 420 auf der C4-Domäne von gp120. Die im Modell mit Amnion-Zellen gezeigte Inhibierung der Transzytose von HIV-1 durch Env362-420 konnte in Versuchen mit CaCo-2-Zellen bestätigt werden.

Zur Identifizierung dieser Domäne wurden zunächst die Oligopeptidpools und anschließend die einzelnen Oligopeptide der inhibierenden Pools eingesetzt. Hier konnten die einzelnen Oligopeptide - bis auf Nr. 37 - den Transport in der gleichen Größenordnung inhibieren wie die jeweiligen Pools. Bei Pool 8 ist dieses Ergebnis dadurch erklärbar, dass sich in diesem Pool ausschließlich das Oligopeptid 38 mit einer hemmenden Wirkung befindet. Da in allen Versuchen jeweils eine Oligopeptidkonzentration von 100 µM eingestellt wurde, befanden sich zudem im Vergleich zu den Versuchen mit den Oligopeptidpools in den Versuchen mit den einzelnen Oligopeptiden diese in einer 5-fach höheren Konzentration. In Pool 7 sind zwei der inhibierenden Oligopeptide vorhanden, es gibt jedoch keine Abnahme der inhibierenden Wirkung, werden die Oligopeptide einzeln eingesetzt. Dieses Phänomen zeigt sich auch, wenn die inhibierenden Oligopeptide 34 bis 38 zusammen bzw. Env362-420 in die



105

Der Transport von HIV-1 durch intakte epitheliale Barrieren des menschlichen Körpers kann als initialer und essentieller Schritt einer HIV-Infektion angesehen werden. In der Literatur sind Transzytoseversuche mit unterschiedlichen Isolaten von HIV-1 und HIV-2 insbesondere mit HIV-1 Gruppe M Subtyp A, B und D beschrieben [Carreno *et al.* 2002, Alfson *et al.* 2001, Bélec *et al.* 2001, Hocini *et al.* 2001, Lagaye *et al.* 2001, Hocini *et al.* 1999, Bomsel *et al.* 1998, Rokos *et al.* 1998, Bomsel *et al.* 1997, Hocini *et al.* 1997]. Alle untersuchten HIV-Isolate werden - mit unterschiedlicher Effizienz - durch Epithelzellen transportiert. Demnach muss die Region auf gp120, welche den Transport von HIV durch Epithelzellen initiieren kann, zwischen den einzelnen Isolaten bzw. Subtypen konserviert sein. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Primärisolate der HIV-1 Gruppe M Subtyp A, C, D, F und G sowie ein Isolat der Gruppe O durch Amnionzellen transportiert werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass durch Vorinkubation der Zellen mit Env362-420 der Transport aller verwendeten Subtypen inhibiert werden konnte. Der Sequenzvergleich zwischen Env362-420 und den Konsensussequenzen der HIV-1 Gruppe M Subtypen zeigte, dass nur bestimmte Aminosäuren zwischen allen Subtypen konserviert sind. Unter der Annahme, dass die den Transport induzierende Region zwischen den Subtypen konserviert sein muss, scheint es sich um ein diskontinuierliches Epitop zu handeln. Die benachbarten konservierten Aminosäuren können jeweils zu Bereichen zusammengefasst werden, somit besteht das Epitop aus zwei Bindungsdomänen. In der Abbildung 40 ist die Aminosäuresequenz des Peptids dargestellt, grau unterlegt sind die über alle Konsensussequenzen der HIV-1 Gruppe M konservierten Aminosäuren.



Zur besseren Beschreibung des Epitops wurde die Konsensussequenz von HIV-1 Gruppe O ausgeschlossen, das hier gezeigte Epitop bezieht sich ausschließlich auf die vorwiegend vorkommende HIV-1 Gruppe M (*major*). In den Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass die unterschiedlichen Isolate der HIV-Subtypen mit einer unterschiedlichen Effizienz transportiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wird der Transport der einzelnen Subtypen unterschiedlich stark durch das Peptid gehemmt, die Inhibierung der Transzytose der Non B-Subtypen ist geringer als die bei Subtyp B. Neben den in Abbildung 40 grau unterlegten konservierten Aminosäuren gibt es möglicherweise weitere Aminosäuren dieser Sequenz, die bei der Rezeptorbindung eine Rolle spielen. Sind diese Aminosäuren in der gp120-Sequenz der Viren vorhanden, ist die Bindung an den Rezeptor effektiv, liegen jedoch Aminosäureaustausche vor, so ist die Wechselwirkung zwischen gp120 und dem zellulären Rezeptor eingeschränkt und der Transport reduziert. Aus den durchgeführten Experimenten können keine weiteren Aminosäuren identifiziert werden, die an der Rezeptorbindung beteiligt sind. Der Vergleich der Ergebnisse wird zudem dadurch erschwert, dass die Transzytoseversuche mit den einzelnen Primärisolaten mit unterschiedlichen Mengen an infektiösen Viren durchgeführt wurden. Die eingesetzten Virusmengen und die Menge an transportierten Viren wurde mit der TaqMan™-PCR bestimmt, da sich die Titration der Primärisolate auf PBMCs als schwierig und kostenintensiv herausgestellt hat. Es ist somit kein direkter Rückschluss auf die Menge an infektiösen Viren und dem Anteil an nicht-infektiösen Partikeln möglich.

In den Versuchen zum Einfluss des Peptids auf die Infizierbarkeit der Zielzellen zeigte sich, dass die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit des Peptids vergleichbar ist zur Kontrollinfektion in Abwesenheit des Peptids. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass Env362-420 die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle nicht beeinflusst. Eine Blockierung der Bindungsstelle durch das Peptid würde eine Bindung von HIV und somit eine Infektion der Zelle verhindern. In Abbildung 41 ist unter B die gefaltete Struktur von gp120 mit Darstellung der Bereiche, die an der CD4-Bindung beteiligt sind, gezeigt (Zeichnung entnommen aus: Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE (1997) *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press). In dieser Darstellung wird deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Domäne auf gp120 (blau umrandet) die Bereiche, die in der CD4-Bindung involviert sind (grau hinterlegt), nicht überschneiden. Die Untersuchung der Seren, die den Transport von HIV-1 inhibiert haben, zeigte ebenfalls, dass Antikörper, die den Transport inhibieren, keine neutralisierende Wirkung besitzen müssen.

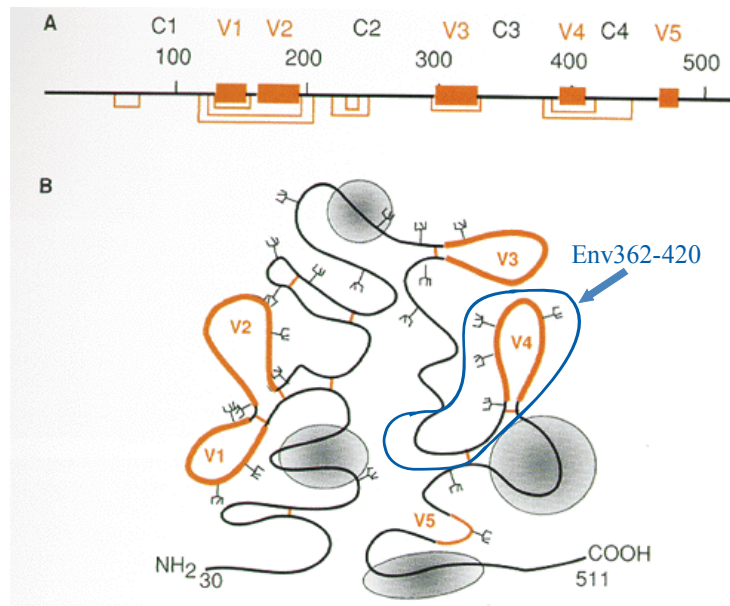


Abb. 41: Schematische Darstellung von HIV-1 gp120: **A** Lineare Darstellung von HIV-1 gp120, variable Domänen gekennzeichnet durch orangefarbene Balken, Disulfidbrücken dargestellt durch orangefarbene Linien. **B** Gefaltete Darstellung von HIV-1 gp120, orangefarbene Darstellung der variablen Bereiche und der Disulfidbrücken, grau hervorgehobene Bereiche stellen die in CD4-Bindung involvierte Domänen dar und blau umrandet ist die identifizierte Sequenz des Peptids Env362-420. (Abbildung modifiziert nach Leonard *et al.* 1990 und Pollard *et al.* 1992, aus Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE (1997) Retroviruses, Cold Spring Harbour Laboratory Press)

Betrachtet man das gp120-Modell nach Leonard und Back (Einleitung, Abbildung 1.3, [Leonard *et al.* 1990, Back 1993]), so liegen höchstens zwei der an der CD4-Bindung beteiligten Aminosäuren in der inhibierenden Sequenz. Abbildung 42 zeigt diese Aminosäuren:

368 370
KQSSGGDP³⁶⁸E³⁷⁰IVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTGSDTITLPCRI

Abb. 42: In CD4-Bindung involvierte Aminosäuren aus Env362-420, die Aminosäuren 368 (D) und 370 (E) (rot) in der Sequenz GDPEI stellen die AS dar, die nach dem Modell von Leonard *et al.* 1990 und Back 1993 in die CD4-Bindung involviert sind.

Hier könnte man die fehlende Beeinflussung der CD4-Bindung durch das Peptid dadurch erklären, dass zwei Aminosäuren zur Bindung des Peptids an den CD4-Rezeptor nicht ausreichend sind und es sich zudem bei Env362-420 um ein lineares Peptid aus 59 Aminosäuren handelt, welches möglicherweise aufgrund der fehlenden räumlichen Struktur und der Größe der Bindungsstelle für CD4 auf gp120 nicht mit den CD4-Rezeptor interagieren kann.

In der Arbeit von Wolbank und Mitarbeitern [Wolbank *et al.* 2003] wird gezeigt, dass keine Transzytose von „zell-assoziierten“ HIV-1 durch intestinale Zellen in Anwesenheit von 2G12 IgM bzw. IgA zu beobachten ist, während 2G12 IgG keinen Einfluss auf die Transzytose besitzt. Im Kapitel 4.1 wird bereits diskutiert, dass die Hemmung der Transzytose nicht darauf beruht, dass die Antikörper direkt an die Domäne, die am Transport beteiligt ist, binden, sondern auf anderen Mechanismen. Das Epitop von 2G12 befindet sich – wie das Peptid – in der Nähe der C4/V4-Region von gp120. Dieses Epitop wird hauptsächlich aus Mannose-Resten der Glykane der Aminosäuren Asparagin an der Position 295 und 332 gebildet. Eine Beteiligung der Glykane der Asparagine an den Positionen 339, 386 und 392 wird diskutiert [Sanders *et al.* 2002, Scalan *et al.* 2002]. Die Aminosäuren an der Position 386 und 392 des postulierten 2G12-Epitops befinden sich in der Aminosäuresequenz des Peptids (Abb. 43).

386 392
 KQSSGGDP~~PE~~IVTH~~SFNC~~GGEFF~~YC~~NSTQ~~LFN~~STW~~F~~NSTWSTEGSNNT~~EGSDT~~~~IT~~LPCRI

Abb. 43: In 2G12-Bindung involvierte Aminosäuren aus Env362-420, die Aminosäuren 386 und 392 (rot) stellen die AS dar, deren Glykane neben weiteren an Aminosäuren gekoppelten Glykanen das Epitop von 2G12 bilden.

Trotz dieser Überlappung der Epitope konnte eine Inhibierung durch 2G12 IgG in den Versuchen nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse können damit erklärt werden, dass an der Bindung von 2G12 an gp120 ausschließlich die Glykane der Aminosäuren 295 und 332 beteiligt sind. Bei einer Durchführung der Transzytoseversuche mit dimeren IgA bzw. pentameren IgM, könnte aufgrund der Größe der Antikörper die räumlich angrenzende Sequenz abgedeckt und die Transzytose inhibiert werden. Neben der Kreuzvernetzung, die ein Ausschleusen bzw. ein Freisetzen der Viren aus den infizierten Zellen verhindert, könnte diese Erklärung auch auf die von Wolbank und Kollegen durchgeführten Versuche mit 2G12 übertragen werden. Nach Freisetzung der Viren aus den infizierten Zellen, die möglicherweise durch die Beteiligung der Aminosäuresequenz ELDKWA nur durch mAk 2F5 gehemmt wird, greifen die für die Transzytose von zellfreien Viren in Anwesenheit von mAk 2G12IgM und IgA beschriebenen Mechanismen der Abdeckung der inhibierenden Domäne.

Als ein Rezeptor auf den Epithelzellen für das Virus wird das Glykosphingolipid Galactosylceramid (GalCer) von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert. GalCer wird besonders auf der apikalen Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert [Simons *et al.* 1988], es ist Bestandteil der Mikrodomänen, welche bei der Endozytose [Brown *et al.* 1998, Rietveld *et al.* 1998] und Transzytose [Verkade *et al.* 2000, Hansen *et al.* 1999] eine wichtige Rolle

spielen. Die Arbeitsgruppe um Morgane Bomsel konnte die Transzytose von zell-assoziierten HIV-1 in Anwesenheit von Antikörpern gegen GalCer auf 12% reduzieren [Bomsel 1997]. Eine Verringerung der Transportrate konnte auch in Versuchen mit zellfreien Viren und Antikörper gegen GalCer gesehen werden, hier wurde der Transport jedoch nur auf 60% reduziert [Hocini *et al.* 2001]. Die Region auf gp120, welche mit dem GalCer-Rezeptor auf den epithelialen Zellen interagieren kann, ist seit 1993 bekannt. Die Aminosäuren 206 bis 275 binden an GalCer-Rezeptoren [Bhat *et al.* 1993]. Diese Aminosäuren liegen im Bereich der in dieser Arbeit verwendeten Oligopeptidpool 4 (AS 182 bis 231) und 5 (AS 232 bis 286). In Versuchen mit den beiden Oligopeptidpools sah man eine Reduktion des Transports gegenüber der Kontrolle. In Anwesenheit des Pools 4 konnte die Transzytose von HIV-1 auf 74% und in Anwesenheit von Pool 5 sogar auf 38% reduziert werden. Die GalCer-bindende Region besitzt einen Einfluss auf die Transzytose von HIV-1, es muss aber einen weiteren noch unbekannten zellulären Rezeptor für die Transzytose von HIV-1 durch die Epithelzellen geben, da die Reduktion mit den Oligopeptidgruppen 7 und 8 effektiver war. Mit Hilfe des Peptids sollte in Weiterführung der Arbeit der Rezeptor auf den Epithelzellen weiter charakterisiert werden können.

4.3 Etablierung eines Peptid-ELISAs zur Untersuchung von Seren auf Antikörper gegen Env362-420

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Seren bzw. Plasmen von HIV-1 infizierten Individuen den Transport von HIV-1 durch humane Amnion-Zellen inhibieren können. Es wurde postuliert, dass die Reduktion in Anwesenheit der HIV-1 positiven Seren auf ein Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen die in den Transport involvierte Domäne auf gp120 beruht. Die Domäne auf gp120, welche den Transport von HIV-1 durch Bindung an einen zellulären Rezeptor initiieren kann, konnte in den Versuchen mit den überlappenden Oligopeptiden weiter charakterisiert werden. Zur Klärung der Frage, ob spezifische Antikörper in HIV-1 positiven Seren für die Inhibierung verantwortlich waren, wurde ein Peptid-ELISA etabliert. Aufgrund der Lektin-bindenden Eigenschaften des Peptids interagiert dieses Peptid auch mit Glykoanteilen der im Serum vorkommenden Immunglobuline der Klasse G (IgG). Dies führt zu hohen Backgroundwerten bei den HIV-1 negativen Seren und erschwerte die Etablierung des ELISAs. Zur Reduzierung des Backgrounds wurden nach Optimierung der übrigen Versuchsbedingungen ELISAs unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Harnstoff in den Probenverdünner, Waschpuffer und Konjugat durchgeführt. Durch Zugabe von Harnstoff sollten die

unspezifischen Bindungen zwischen den Glykoanteilen der Immunglobulinen und dem Peptid gelöst werden. Eine Erniedrigung der Werte der negativen Seren konnte nicht beobachtet werden, jedoch eine Zunahme der Extinktionen bei HIV-1 positiven Seren. Die stark variierenden Werte bei den negativen Seren lassen sich durch unterschiedliche Mengen an IgG erklären. Bei HIV-1 positiven Seren konkurrieren die spezifischen Antikörper mit den noch im Serum vorhandenen Liganden (Glykoseitenketten) um die Bindung an das Peptid. Durch Harnstoff werden diese Bindungen wieder gelöst, es entsteht eine neue Konkurrenz um die freien Bindungsstellen und neue Möglichkeiten zur spezifischen Bindung. Spezifisch gebundene Antikörper sollten durch Harnstoff in den eingesetzten Konzentrationen nicht verdrängt werden.

Der mit Harnstoff-Zugabe optimierte Peptid-ELISA wurde zur Untersuchung der HIV-1 positiven Seren und Plasmen verwendet. Die HIV-1 positiven Seren der ersten Versuche als auch die Seren der Long Term Non-Progressor, die in den Transzytoseversuchen eine inhibierende Wirkung besessen haben, verfügen über Antikörper gegen das Oligopeptid. Es zeigte sich jedoch, dass die Seren der LTNPs im Mittel geringere Antikörpertiter gegen Env362-420 besaßen als die HIV-1 positiven Seren der ersten Versuche, obwohl die Seren der LTNPs die Transzytose um etwa den Faktor 5 besser inhibiert haben als die HIV-1 positiven Seren. Bei der Untersuchung der Plasmen der dokumentierten Serokonversion zeigte sich zudem, dass alle Plasmen, einschließlich derer, die den Transport inhibieren konnten, nicht über Antikörper gegen das Peptid verfügen. Im ELISA werden im Wesentlichen nur solche Antikörper reagieren, die gegen lineare Epitope gerichtet sind, Antikörper gegen konformationsabhängige Epitope jedoch nicht. Die Blockierung der Transzytose durch Antikörper bei den Serokonvertern konnte auf der Induktion vor allem von konformationsabhängigen Antikörpern beruhen. Auch die Diskrepanz zwischen der Inhibierung der Transzytose und den Antikörpertitern bei den Seren der LTNPs ließe sich mit konformationsabhängigen Antikörpern erklären.

Nachdem ein Zusammenhang zwischen der Inhibierung der Transzytose und dem Vorkommen von Antikörpern gegen Env362-420 gemessen werden konnten, sollte die Frage geklärt werden, ob die Anwesenheit von Antikörpern gegen die Transzytosedomäne einen Einfluss auf die Prognose einer Infektion mit HIV besitzt. Eine Infektion mit HIV-1 führt, ob mit oder ohne antiretrovirale Therapie, von Patient zu Patient zu sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen. Hierbei spielt die Dauer der Latenzphase vor Einsetzen der ersten HIV-assoziierten Symptome, die auf einen fortschreitenden Immundefekt schließen lassen, eine

entscheidende Rolle. Bei der Etablierung des Peptid-ELISAs mit einer Reihe von HIV-positiven Seren wurde nicht in allen Seren Antikörper gegen Env362-420 nachgewiesen. Hier könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Expression von Antikörpern gegen die Transzytosedomäne nicht bei jedem Patienten stattfindet und somit die unterschiedliche klinische Progression - neben weiteren Faktoren - damit zusammenhängen könnte. Bezüglich dieser Fragestellung wurden sowohl Verlaufsseren als auch dokumentierte Serokonversionen auf Antikörper gegen Env362-420 untersucht. Das erste Studienkollektiv beinhaltete Verlaufsseren von Patienten, die entweder über den gesamten Untersuchungszeitraum an AIDS erkrankt waren, die sich in der Latenz oder im LAS/ARC-Stadium befanden oder von Patienten, die in dieser Zeit eine Stadienprogredienz durchmachten. Einen Einfluss auf die Prognose der Krankheit durch Hemmung der Transzytose von HIV-1 im Körper HIV-infizierter Patienten konnte mit den Seren definierter Krankheitsverläufe über den Nachweis von Antikörpern gegen das lineare Oligopeptid Env362-420 nicht gesehen werden. Fast alle untersuchten Seren waren im Peptid-ELISA reaktiv, Patienten im AIDS-Stadium hatten nach den Patienten im LAS/ARS-Stadium im Mittel sogar die höchsten Extinktionen. Zur Stützung der Hypothese, dass Antikörper gegen Env362-420 einen positiven Einfluss auf die Prognose der Krankheit haben könnten, sollten die Seren aus der Latenzphase die höchsten und die Seren aus der Stadienprogredienz sowie der AIDS-Patienten die geringsten Extinktionen haben. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass die Patienten teilweise stark erhöhte IgG-Konzentrationen im Blut aufwiesen. Eine erhöhte IgG-Konzentration könnte aufgrund der Lektin-bindenden Eigenschaften von Env362-420 zu falsch erhöhten Extinktionen führen. Rechnet man die gemessenen Extinktion mit einem Faktor um, sodass sich die Extinktionen bei allen Proben auf einen IgG-Gehalt von 16 g/l beziehen, verringern sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Tabelle 25). Es gibt bei Patienten in unterschiedlichen Phasen der HIV-Infektion nur geringfügige Unterschiede in der Antikörperexpression gegen das lineare Env362-420, somit ist kein Rückschluss auf die Prognose der Krankheit möglich. Die Untersuchung der Verlaufsseren ließ den Schluss zu, dass bei einer manifestierten Infektion die Transzytose keine Rolle bezüglich der Prognose der Krankheit spielt. Es bleibt jedoch noch die Frage offen, ob über den Nachweis von konformationsabhängige Antikörper ein Rückschluss auf die Prognose der Krankheit möglich wäre.

Tab. 25: Korrektur der ermittelten Extinktionen in den einzelnen Studienkollektiven.

Patientenkollektiv	Mittelwert gemessene Extinktion im Peptid-ELISA	Mittelwert IgG [g/l]	Mittelwert korrigierte Extinktion (bezogen auf 16 g/l IgG)
AIDS	0,503	23,6	0,344
Stadienprogression	0,413	25,1	0,288
Latenz	0,349	19,9	0,268
LAS/ARC	0,554	23,9	0,376

Aufgeführt sind die Mittelwerte der Extinktion von jedem Kollektiv, die Mittelwerte der IgG-Konzentrationen und die Mittelwerte bezogen auf einen IgG-Gehalt von 16 g/l (ausführliche Tabelle im Anhang unter Tab. 31).

Das zweite Studienkollektiv beinhaltete Seren dokumentierter Serokonversionen, die soweit auf unterschiedliche HIV-Marker untersucht waren, dass eine Laborphaseneinteilung nach Fiebig [Fiebig *et al.* 2003] möglich war. In Abbildung 44 ist die der Einteilung zugrunde liegende Laborphaseneinteilung grafisch dargestellt und in der Tabelle 26 die Progression der unterschiedlichen HIV-Marker in den einzelnen Phasen aufgeführt.

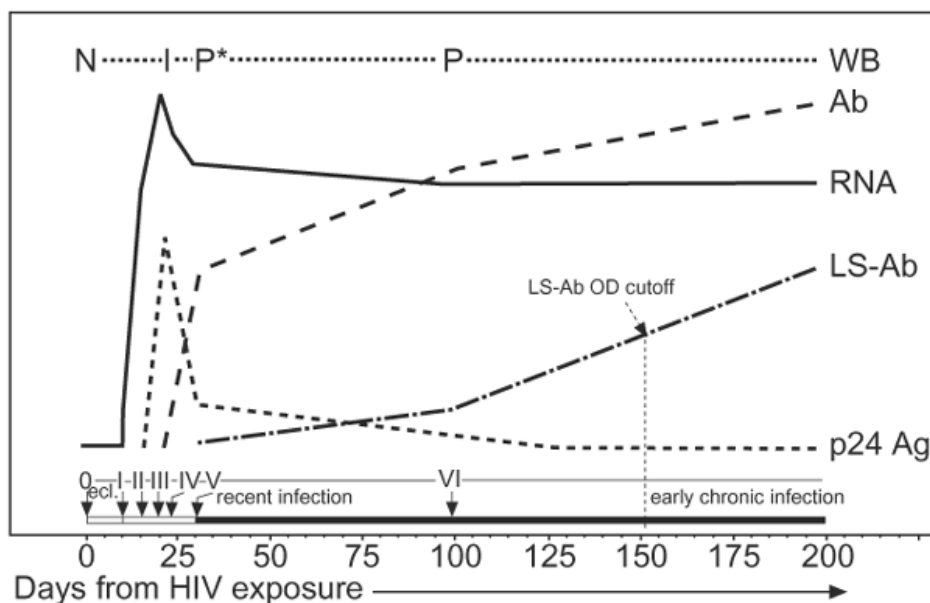


Abb. 44: Laborphasen der primären HIV-Infektion (Abbildung entnommen aus Fiebig *et al.* 2003) WB: Western Blot (N negativ, I unbestimmt, P* positiv ohne p31 Bande, P positiv mit p31 Bande), Ab: HIV-Antikörper, RNA: HIV-RNA, LS-Ab: HIV-Ak bestimmt mit einem sensitiven/weniger sensitiven ELISA, p24 Ag: HIV p24-Antigen. Erklärung der mit I bis VI benannten Laborphasen in Tabelle 26.

Tab. 26: Tabellarische Darstellung der Laborphasen einer primären HIV-Infektion (zu Abb. 44, Fiebig *et al.* 2003)

Laborphasen	Tage nach Infektion	Dauer [Tage]	Laborparameter
0	0	-	Zeitpunkt der Infektion
I	12	3-5	Nachweis HIV-spezifischer RNA im Blut
II	17	3-5	RNA-Nachweis und p24-Antigen-Test positiv, keine Antikörper
III	22	3-5	HIV-IgM-spezifischer ELISA positiv, Western Blot negativ
IV	27	3-5	wie III, fraglicher Western Blot
V	32	69,5	wie IV, reaktiver Western Blot ohne p31-Bande
VI	> 100	ohne Endpunkt	wie V, Western Blot mit p31-Bande

In der Tabelle 26 ist die Einteilung der untersuchten Seren in die einzelnen Laborphasen dargestellt. Von einer dokumentierten Serokonversion (Patient A-E aus Kapitel 3.6.1) sind Seren zu jeder Laborphase vorhanden. Bei den anderen Serokonversionen sind aus den frühen Phasen (I und II) keine Proben vorhanden, sonst entweder ab Phase III oder IV (mit Ausnahme von Patient f: erst ab Phase V). Gleichzeitig wurde in Tabelle 27 den einzelnen Phasen die Ergebnisse aus dem Peptid-ELISA zugeordnet. Gab es mehrere Seren zu einer Laborphase wurden, bei unterschiedlicher Antikörperexpression, diese in der Tabelle vermerkt. Die Antikörperproduktion gegen Env362-420 ist von Patient zu Patient sehr unterschiedlich. In den Seren der Patienten A-E und a sind zu keiner Abnahme Antikörper gegen Env362-420 nachweisbar. Die Patienten b und c dagegen verfügen schon in der frühen Laborphase III über Antikörper gegen die Transzytosedomäne. Nach der Laborphaseneinteilung dürften zu diesem Zeitpunkt nur IgM-Antikörper gegen HIV gebildet worden sein, die Reaktivität im Peptid-ELISA ist somit nur durch eine Detektion von IgM-Antikörpern gegen Env362-420 zu erklären. Der im Peptids-ELISA verwendete POD-konjugierte Antikörper soll laut Hersteller nur IgG detektieren, vielleicht ist jedoch bei einem hohen Background an IgM-Antikörpern eine Detektion dieser nicht auszuschließen. Während bei Patient c schon nach kurzer Zeit keine Antikörper mehr gegen die Transzytosedomäne nachweisbar sind, bleiben sie bei Patient b fast in jeder folgenden Probe nachweisbar. Auch die Seren der Patienten d, e und f verfügen ab Phase IV bzw. V über Antikörper. Hier sind Seren aus früheren Phasen nicht vorhanden.

Tab. 27: Einteilung der Seren der dokumentierten Serokonversionen in die Laborphasen der primären HIV-Infektion und Zuordnung der ELISA-Ergebnisse,

Phase der Infektion	Patient						
	A-E	a	b	c	d	e	f
I	—	nb	nb	nb	nb	nb	nb
II	—	nb	nb	nb	nb	nb	nb
III	—	nb	+	+	nb	nb	nb
IV	—	—	—	—	(+)	+/-	nb
V	—	—	+	—	+/-	+	+/-
VI	—	—	+/-	—	—	+	+

Detaillierte Aufführung der Stadieneinteilung unter Tabelle 32 im Anhang, Patient A-E = Seren der dokumentierten Serokonversion aus Kapitel 3.6.1, Patienten a bis f nur im Peptid-ELISA getestete Seren aus Kapitel 3.8.7.3, nb Seren aus dieser Phase der Infektion sind nicht vorhanden, +: nur positive Ergebnisse aller Seren aus dieser Phase, (+): nur schwach positive Ergebnisse aller Seren aus dieser Phase, +/-: erste Seren dieser Phase positiv folgende negativ, —: nur negative Ergebnisse aller Seren dieser Phase.

Bei den Patienten mit einer frühen Antikörperbildung könnte die Ausbreitung von HIV im Körper – hier insbesondere in immunologisch privilegierte Bereiche - behindert werden. Bei der Ausbreitung von HIV im menschlichen Körper ist das Virus auch in Kompartimenten des menschlichen Körpers nachweisbar, die vom übrigen Körper immunologisch getrennt sind. Zu diesen Kompartimenten zählen das Gehirn, die Augen, der Hoden beim Mann und der Uterus (Fetus) bei der Frau. Diese Regionen werden durch physiologische Schranken (z.B. Blut-Hirn Schranke, Blut-Testis Schranke) vom peripheren Blut bzw. Immunsystem getrennt. Trotz dieser vorhandenen Schranken, die zusätzlich vor einem Eindringen von Pathogenen und Toxinen schützen soll, wird HIV in der Samenflüssigkeit des Mannes [Krieger *et al.* 1991] und im zentralen Nervensystem [An *et al.* 1999, Resnick *et al.* 1988] gefunden. Die Samenflüssigkeit setzt sich aus unterschiedlichen Flüssigkeiten und Zellen verschiedener Organe zusammen: reife Spermien aus dem Keimzell-Kompartiment (Tubulus contortus = Ort der Spermio-genese im Hoden), Sekrete unterschiedlicher Drüsen (u.a. Prostata), abgeschilferte Epithelzellen der Harnröhre und Leukozyten. Im Falle einer HIV-Infektion kann sowohl zellfreies Virus als auch HIV-infizierte Lymphozyten und Makrophagen [Quayle *et al.* 1997, Mermin *et al.* 1991] in der Samenflüssigkeit nachwiesen werden. Über die Herkunft der HIV-infizierten Zellen und zellfreien Viren wird noch diskutiert. Als Ursprung kommen entweder die akzessorischen Drüsen und die Harnröhre oder der Hoden mit den Keimzell-Kompartiment in Frage [Kiessling *et al.* 1995, Tomlinson *et al.* 1992, Olsen *et al.* 1984]. Da der Hoden unter einer speziellen immunologischen Regulation liegt, vermutet man, dass die Leukozyten dort ein isoliertes Reservoir – getrennt von den Leukozyten des

peripheren Bluts – repräsentieren. In der Literatur wird die Vermutung aufgestellt, dass die HIV-infizierten Zellen lokal im Hoden produziert werden und somit das Resultat eines Transports von zellfreiem Virus über die Blut-Testis Schranke und einer anschließenden Infektion der im Hoden vorhandenen Lymphozyten und Makrophagen darstellen. Untersuchungen zur Viruslast im peripheren Blut im Vergleich zur Samenflüssigkeit als auch die Analyse der Gensequenzen der in den beiden Körperflüssigkeiten vorkommenden Viruspopulationen haben gezeigt, dass die Viruslast in der Samenflüssigkeit von der im Blut unabhängig ist und die Leukozyten in der Samenflüssigkeit ein getrenntes HIV-Reservoir zum peripheren Blut darstellen [Byrn *et al.* 1998, Kiessling *et al.* 1998, Byrn *et al.* 1997]. Als ein vom übrigen Körper distinktes HIV-Reservoir für Reinfektionen wird auch das Zentrale Nervensystem (ZNS) diskutiert. Das ZNS gehört zu den immunologisch privilegierten Bereichen und wird durch die Blut-Hirn Schranke vom peripheren Blut getrennt. Einige Publikationen konnten zeigen, dass HIV von den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke über einen ähnlichen Mechanismus wie bei der Transzytose von HIV durch Epithelzellen aufgenommen und auf der anderen Seite infektiös wieder freigesetzt werden kann [Banks *et al.* 1997]. Im ZNS kann nun die Infektion von Mikroglia-Zellen und Makrophagen erfolgen [An *et al.* 1999, Bagasra *et al.* 1996, Moses *et al.* 1994, Wiley *et al.* 1986]. Virale Proteine wie gp160 sind toxisch für die Zellen des ZNS und mit fortschreitender Infektion wird die Blut-Hirn Schranke für die weitere Invasion von HIV zerstört und es kommt zu einer Dysfunktion des ZNS. Die Infektion des Gehirns mit HIV kann zu einer HIV-assoziierten Enzephalopathie (HIVE) führen. HIVE tritt bei 15-20% der nicht therapierten Patienten im Stadium der kompletten Immunsuppression auf. Bei den Patienten, die schon in der frühen Infektionsphase über Antikörper gegen die Transzytosedomäne verfügten, könnte die Ausbreitung der Viren in die „abgeschotteten“ Kompartimente im Körper inhibiert werden. Das Anlegen von Virusreservoirs, die vom Immunsystem und der antiretroviralen Therapie abgetrennt sind, ist dadurch eingeschränkt. Hier wäre dadurch ein positiver Einfluss auf die Prognose der Krankheit möglich. Mit Hilfe der untersuchten Serokonversionen kann nur eine Aussage über den unterschiedlichen Beginn der Antikörperexpression getroffen werden, jedoch liegen keine weiteren Daten zur Krankheitsentwicklung vor. Alle untersuchten Patienten wurden schon in der Phase der Serokonversion therapiert.

4.4 Entwicklung von Immunseren gegen Env362-420

Zur Entwicklung von Antikörpern, die die Transzytose von HIV-1 durch epitheliale Zellen hemmen, wurden Kaninchen mit Env362-420mod. immunisiert. Die Immunseren wurden –

wie auch die Präseren – im Peptid-ELISA, im Synzythien-Inhibierungsassay, im Western Blot und im Immunfluoreszenztest untersucht. Bei den Immunseren zeigte sich ein Unterschied zwischen dem im Peptid-ELISA ermittelten hohen Antikörpertiter und der im Immunfluoreszenztest ermittelten Bindung an virales gp120. Bei der Immunisierung der Kaninchen mit dem linearen Peptid werden im wesentlichen Antikörper gegen lineare Epitope gebildet. Die Konformation des Peptids stimmt nicht mit der nativen, dreidimensionalen Struktur dieser Domäne überein und es ist somit wahrscheinlich, dass die gebildeten Antikörper nicht effizient an gp120 binden. Die Glykosylierung des gp120 könnte ebenfalls die Spezifität der Bindung beeinträchtigen. Bei der Durchführung des Peptid-ELISA mit Platten, die mit Env362-420 und nicht mit Env362-420mod. beschichtet waren, zeigte sich eine Reduktion des Antikörpertiters bei Tier 1 von 1:128.000 um den Faktor 16 auf 1:8000. Schon der Austausch von vier Aminosäuren führt zu einer geringeren Bindung an ein lineares Peptid, so ist eine Reduktion der Bindung der Antikörper an natives gp120 von HIV-1_{IIIB}, welcher die Sequenz von Env362-420 trägt, nicht überraschend.

Werden die Immunseren in den Konzentrationen in Transzytoseversuche eingesetzt, die auch ein positives Signal im IFT hervorgerufen haben, so kann der Transport von HIV-1 im Vergleich zur Kontrolle mit den Präseren um den Faktor 8 reduziert werden. Die Transzytose von HIV ist durch Immunseren, die gegen die Domäne Env362-420 auf gp120 gerichtet sind, prinzipiell zu hemmen. Weitere Untersuchungen zur Eingrenzung der Epitope auf gp120, die an dem Transport von HIV-1 beteiligt sind, wären im Hinblick auf eine Impfung (passiv oder aktiv) notwendig. Immunseren, die nur gegen einen Teil der Sequenz gerichtet sind, könnten den Transport effektiver inhibieren. Es wäre zudem zu diskutieren, ob Antikörper, die durch Immunisierung mit einem nicht-linearen Peptid (dh. mit einer Disulfidbrücke zwischen dem Cystein an Position 385 und dem Cystein an Position 418), erhalten werden, die Transzytose effizienter inhibieren können.

4.5 Transzytose von HIV-1_{IIIB} durch menschliche Eihaut

Die mit dem Amnion-Modellsystem zur Untersuchung der Transzytose erzielten Ergebnisse wurden in Versuchen mit menschlicher Eihaut auf komplexe Gewebe übertragen. Hierzu wurde der Transport von HIV-1_{IIIB} durch die menschliche Eihaut unterschiedlicher Spenderinnen nach Vorinkubation der Viren mit den Immunseren oder den dazugehörigen Präseren untersucht. Eine Reduktion der Transzytose in Anwesenheit der Immunseren konnte nicht festgestellt werden. Demnach muss ein zweiter Rezeptor auf epithelialen Zellen

existieren, der ebenfalls den Transport von HIV-1 initiieren kann. In Kapitel 4.3 wird das Glykosphingolipid Galactosylceramid (GalCer) als weiterer Rezeptor für die Transzytose von HIV-1 beschrieben. Dieser Rezeptor wird ebenfalls auf epithelialen Zellen exprimiert. Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Hemmung der Transzytose mit Env362-420 bzw. mit Immunseren gegen diese Domäne können damit erklärt werden, dass beide Rezeptoren den Transport von HIV-1 initiieren können. Welcher Rezeptor hauptsächlich zum Transport gebraucht wird, hängt von der Expression dieser Rezeptoren auf der jeweiligen epithelialen Zelle ab. Im verwendeten Modellsystem zur Identifizierung der involvierten Domäne auf gp120 wurden permanente Amnionzellen eingesetzt, die den Rezeptor exprimieren, der von Env362-420 erkannt wird. Im Eihautmodell besteht jedoch die Zellschicht aus dem - der mütterlichen Seite zugewandten - Chorion und dem – der kindlichen Seite zugewandten – Amnion. Zur Erreichung des unteren Kompartiments des Versuchsaufbaus müssen die Viren erst die Chorion- und anschließend die Amnionschicht überwinden. Die unterschiedlichen Ergebnisse zu dem Modellsystem mit Amnionzellen können damit erklärt werden, dass der Transport durch die Chorionschicht durch einen alternativen Rezeptor initiiert wird. Ein möglicher Grund dafür könnte eine geringere Expression des „Env362-420-Rezeptors“ sein. Bei dem alternativen Rezeptor könnte es sich dann um das oben bereits erwähnte Galactosylceramid handeln. Da die Sequenz auf gp120, welche mit GalCer interagiert, bekannt ist, könnte diese Vermutung durch Transzytoseversuche mit menschlichen Eihaut entweder mit den der Sequenz entsprechenden Oligopeptiden oder einem neu synthetisierten Peptid untersucht werden. Hinweise auf Unterschiede im Transportmechanismus zwischen Epithelzellen unterschiedlicher Herkunft zeigten sich auch schon während einer in der Arbeitsgruppe durchgeführten Doktorarbeit [Seeger 2003]. Hier wurde der Einfluss von bestimmten Inhibitoren auf den Transport von HIV-1 und HSV-1 durch Mundschleimhautepithelzellen und menschlicher Eihaut untersucht. Dabei fördert z.B. Mucin den Transport von HSV-1 durch die menschliche Eihaut und inhibiert den Transport durch primäre Mundschleimhautepithelzellen. Auch hier wurden unterschiedliche Rezeptoren für den Transport auf den verwendeten Epithelzellen diskutiert.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Domäne auf gp120 identifiziert werden, welche in den Transport von HIV-1 durch Amnionzellen involviert ist. Durch Sequenzalignments zwischen dieser Sequenz und den Konsensussequenzen der HIV-1 Subtypen aus der Gruppe M konnten die über alle getesteten Subtypen konservierten Aminosäuren ermittelt werden. Unter der

Annahme, dass diese Domäne über die Subtypen konserviert ist und unter Berücksichtigung der Alignments könnte das Epitop auf 25 konservierte Aminosäuren reduziert werden. Es würde sich dabei um diskontinuierliche Erkennungsstrukturen bestehend aus 2 konservierten Bereichen zwischen den Aminosäuren 362 und 420 handeln. Env362-420 hemmt die Infektion von CD4-positiven Zellen nicht, Antikörper gegen diesen Bereich besitzen keine messbare neutralisierende Wirkung. In Seren von HIV-1 positiven Individuen, die den Transport von HIV-1_{IIIB} durch epitheliale Zellen inhibiert haben, konnten Antikörper gegen Env362-420 nachgewiesen werden. Ebenso konnte die Transzytose von HIV-1 durch Immunseren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit Env362-420_{mod.} gewonnen wurden, inhibiert werden. Damit konnte die Hypothese aus Kapitel 4.1 gestützt werden, dass der Transport durch Antikörper gegen diese Domäne gehemmt werden kann. Ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von Antikörpern gegen Env362-420 und dem Risiko einer vertikalen Transmission von HIV-infizierten Müttern bestehen könnte, wäre möglich, müsste jedoch noch geklärt werden. Untersuchungen von Verlaufsseren auf Antikörper gegen Env362-420 haben gezeigt, dass Patienten mit einer etablierten Infektion unabhängig vom Krankheitsstadium über Antikörper gegen diesen Env-Bereich verfügen und somit ein Einfluss auf die Prognose der Krankheit nicht zu belegen ist. Jedoch im Gegensatz dazu gibt es in der frühen Infektionsphase Unterschiede im Zeitpunkt der beginnenden und der Dauer der Antikörperexpression. In dieser Phase könnte durch Hemmung der Transzytose eine Ausbreitung von HIV in immunologisch privilegierte Bereiche wie das Gehirn und der Hoden beeinträchtigt werden. Darüber hinaus kann die Inhibierung des Transportes über die Blut-Hirn Schranke eine antiretrovirale Therapie in ihrem Erfolg unterstützen. Studien haben gezeigt, dass der Wirkstoffspiegel der antiretroviralen Medikamente im ZNS deutlich geringer liegen als im Serum, so dass die Gefahr besteht, dass die wirksame antivirale Konzentration nicht erreicht wird und sich dort ein Virusreservoir – unabhängig vom Selektionsdruck durch die Medikamente – halten kann. Im Weiteren kann durch Inhibierung des Transportes von HIV über die Blut-Testis Schranke die Viruslast in der Samenflüssigkeit reduziert werden. Es ist beschrieben, dass von der Viruslast im Blut kein Rückschluss auf die Viruslast in der Samenflüssigkeit gezogen werden kann. So führt eine Reduktion der Viruslast während der antiretroviralen Therapie im Blut nicht zwangsläufig auch zu einer verminderten Infektiosität der Samenflüssigkeit [Byrn *et al.* 1998, Liuzzi *et al.* 1996, Hamed *et al.* 1993]. Mit der Identifizierung der Domäne Env362-420 auf gp120 ist man der Identifizierung des Rezeptors auf der epithelialen Zelloberfläche, der den Transport von HIV initiiert, einen großen Schritt näher gekommen und somit auch der Aufklärung des

Transportmechanismen. Diese Erkenntnisse ermöglichen in der Zukunft die Etablierung neuer Interventionsmaßnahmen gegen die Übertragung von HIV von der Mutter auf das Kind. Als in Frage kommende Strategien wäre eine aktive oder passive Immunisierung bzw. das Design von synthetischen Inhibitoren zu nennen. Die Durchführung von Inhibitionsversuchen mit Env362-420 bzw. der Immunseren mit menschlicher Eihaut lassen die Vermutung zu, dass ein weiterer – möglicherweise bereits in der Literatur beschriebener - Rezeptor für den Transport verantwortlich ist. In weiteren Untersuchungen zum Einfluss der Transzytose auf den Krankheitsverlauf muss geklärt werden, welcher Rezeptor auf den unterschiedlichen Epithelzellen jeweils den Transport von HIV initiiert. Im Bezug auf die Prävention einer Infektion mit HIV sollte der Transport durch Schleimhautzellen in Anwesenheit von Env362-420 näher untersucht werden. Erste Hinweise darauf, dass Epithelzellen, die bei der sexuellen Übertragung von HIV eine Rolle spielen (Zellen des weiblichen Genitaltraktes sowie Zellen des Intestinaltraktes), Env362-420mod. binden können und somit in der Lage sind, HIV über diesen Mechanismus zu transportieren, zeigen die Immunfluoreszenzbilder im Kapitel 3.8.9. Die Infektion des Menschen mit HIV könnte demnach nach folgendem Mechanismus ablaufen: das Glykoprotein gp120 bindet über die Domäne Env362-420 an epitheliale Zellen und initiiert dadurch die Transzytose des Viruspartikels durch die Epithelzelle bzw. durch Zellschichten. Dendritische Zellen in der Epithelschicht können dann gp120 über DC-SIGN binden und im Organismus weiter verbreiten (siehe Abb. 45).

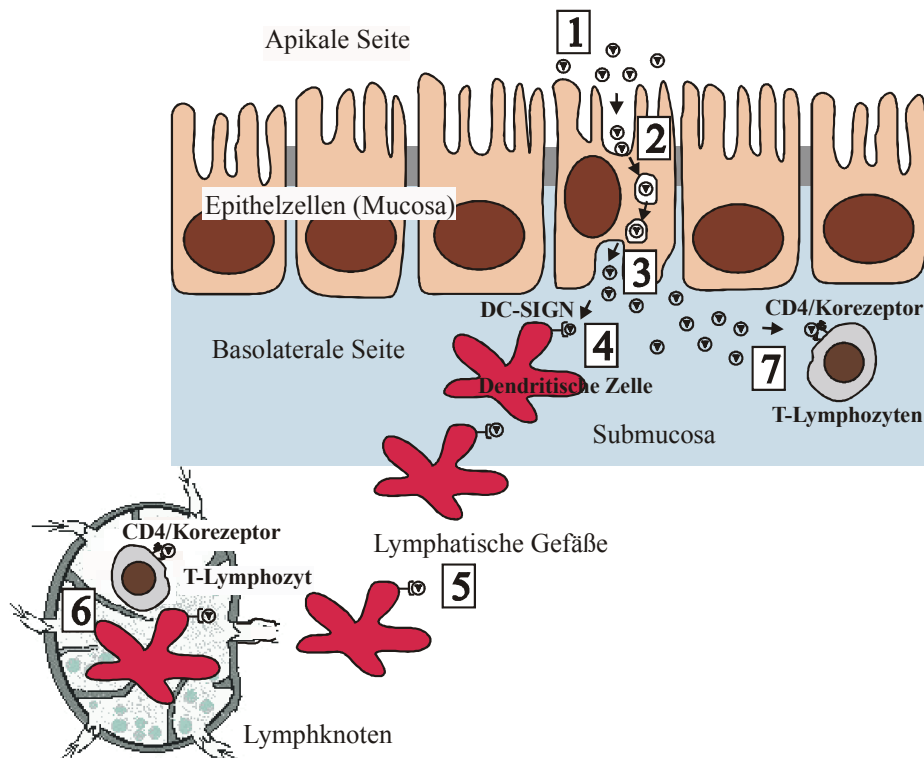


Abb. 45: Schematische Darstellung einer HIV-Infektion über eine intakte Schleimhaut.

1. Zellfreie Viren aus Körperflüssigkeiten wie z.B. Samenflüssigkeit. 2. Binden der zellfreien Viren über die Transzytosedomäne Env362-420 an einen zellulären Rezeptor mit anschließender Transzytose durch die epitheliale Zelle. 3. Freisetzung der infektiösen Viren auf der basolateralen Seite. 4. Binden der freien Viren an DC-SIGN auf dendritischen Zellen der Submucosa. 5. Transport von HIV, gebunden an dendritische Zellen, durch die lymphatischen Gefäße zu den Lymphknoten. 6. Infektion von CD4⁺ T-Lymphozyten im Lymphknoten. 7. Infektion von in der Submucosa vorkommender CD4⁺ T-Lymphozyten.

Literaturverzeichnis

- AIKEN C, KONNER J, LANDAU NR, LENBURG ME, TRONO D (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76(5), 853-864
- ALFSEN A, INIGUEZ P, BOUGUYON E, BOMSEL M (2001) Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 166, 6257-6265
- ALKHATIB G, COMBADIÈRE C, BRODER CC, FENG Y, KENNEDY PE, MURPHY PM, BERGER EA (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272(5270), 1955-1958
- AN SF, GROVES M, GRAY F, SCARAVILLI F (1999) Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(11), 1156-1162
- ARTHUR LO, BESS JW JR, SOWDER RC 2ND, BENVENISTE RE, MANN DL, CHERMANN JC, HENDERSON LE (1992) Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Sciences* 258(5090), 1935-1938
- BABA TW, JEONG YS, PENNICK D, BRONSON R, GREENE MF, RUPRECHT RM (1995) Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Sciences* 267, 1820-1825
- BABA TW, TRICHEL AM, AN L, LISKA V, MARTIN LN, MURPHEY-CORB M, RUPRECHT RM (1996) Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science* 272, 1486-1489
- BABA TW, LISKA V, HOFMANN-LEHMANN R, VLASAK J, XU W, AYEJUNIE S, CAVACINI LA, POSNER MR, KATINGER H, STIEGLER G, BERNACKY BJ, RIZVI TA, SCHMIDT R, HILL LR, KEELING ME, LU Y, WRIGHT JE, CHOU TC, RUPRECHT RM (2000) Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 6, 200-206
- BACK NK (1993) HIV-1 neutralization: antibody specificity and possible viral escape mechanisms. Dissertation, Universität Amsterdam
- BAGASRA O, LAVI E, BOBROSKI L, KHALILI K, PESTANER JP, TAWADROS R, POMERANTZ RJ (1996) Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *AIDS* 10, 573-585
- BALTIMORE D (1970) Viral-RNA dependent DNA polymerase: RNA dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211
- BANKS WA, KASTIN AJ, AKERSTROM V (1997) HIV-1 protein gp120 crosses the blood-brain barrier: role of adsorptive endocytosis. *Life Sciences* 61(9), 119-125
- BARRE-SINOSSI F, CHERMAN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, DAUGUET C, AXLER-BLIN C, VEZINET-BRUN F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNIER L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 220, 868

- BASHIROVA AA, GEIJTENBEEK TBH, VAN DUJNHOFEN GCF, VAN VLIET SJ, EILERING JB, MARTIN MP, WU L, MARTIN TD, VIEBIG N, KNOLLE PA, KEWALRAMANI VN (2001) A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193, 671-678
- BECQUART P, HOCINI H, LEVY M, SEPOU A, KAZATCHKINE MD, BELEC L (2000). Secretory anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in colostrum and breast milk are not a major determinant of the protection of early postnatal transmission of HIV. *J Inf Dis* 181, 532-539
- BÉLEC L, GHYS PD, HOCINI H, NKENGASONG JN, TRANCHOT-DIALLO J, DIALLO MO, ETTIÈGNE-TRAORE V, MAURICE C, BECQUART P, MATTA M, SI.MOHAMED, CHOMONT N, COULIBALY IM, WIKTOR SZ, KAZATCHKINE MD (2001) Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative african women. *J Inf Dis* 184, 1412-1422
- BERKOWITZ RD, GOFF SP (1994) Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein. *Virology* 202(1), 233-246
- BESS JW JR, POWELL PJ, ISSAQ HJ, SCHUMACK LJ, GRIMES MK, HENDERSON LE, ARTHUR LO (1992) Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type I, and other retroviruses. *J Virol* 66(2), 840-847
- BHAT SR, METTUS V, REDDY EP, UGEN KE, SRIKANTHAN V, WILLIAMS WV, WEINER DR (1993) The galactosyl ceramide/ sulfatide receptor binding region of HIV-1 gp120 maps to amino acids 206-275. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 175-181
- BLEUL CC, FARZAN M, CHOE H, PAROLIN C, CLARK-LEWIS I, SODROSKI J, SPRINGER TA (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382(6594), 829-833
- BOMSEL M (1997) Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 3(1), 42-47
- BOMSEL M, HEYMAN M, HOCINI H, LAGAYE S, BELEC L, DUPONT C, DESGRANGES C (1998) Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 9, 277-287
- BOWEN JM, CHAMLEY L, MITCHELL MD, KEELAN JA (2002) Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis secretion and roles in establishment of pregnancy in woman. *Placenta* 23, 239-256
- BOWERMAN B, BROWN PO, BISHOP JM, VARMUS HE (1989) A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* 3(4), 469-478
- BROLIDEN K, HINKULA J, DEVITO C, KIAMA P, KIMANI J, TRABBATONI D, BWAYO JJ, CLERICI M, PLUMMER F, KAUL R (2001) Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol letters* 79, 29-36

- BROWN DA, LONDON E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Del Biol* 14, 103-114
- BROWN PO, BOWERMAN B, VARMUS HE, BISHOP JM (1989) Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursors, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(8), 2525-2529
- BRY K, HALLMAN M (1992) Transforming growth factor-beta opposes the stimulatory effects of interleukin-1 and tumor nekrosis factor on amnion cell prostaglandin E2 production: implication for preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 167, 222-226
- BUCHACHER A, PREDL R, STRUTZENBERGER K, STEINFELLNER W, TRKOLA A, PURTSCHER M, GRUBER G, TAUER C, STEINDL F, JUNGBAUER A, KATINGER K (1994) Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins, electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 359-369
- BUKRINSKY MI, SHAROVA N, DEMPSEY MP, STANWICK TL, BUKRINSKAYA AG, HAGGERTY S, STEVENSON M (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(14), 6580-6584
- BUKRINSKY MI, SHAROVA N, McDONALD TL, PUSHKARSKAYA T, TARPLEY WG, STEVENSON M (1993) Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(13), 6125-6129
- BYRN RA, ZHANG D, EYRE R, MCGOWAN K, KIESSLING AA (1997) HIV-1 in semen: an isolated virus reservoir. *Lancet* 350, 1141
- BYRN RA, KIESSLING AA (1998) Analysis of human immunodeficiency virus in semen: indications of a genetically distinct virus reservoir. *J Reprod Immunol* 41(1-2), 161-176
- CARRENO M-P, KRIEFF C, IRINOPOULOU T, KAZATCHKINE MD, BÉLEC L (2002) Enhanced transcytosis of R5-tropic human immunodeficiency virus across tight monolayer of polarized human endometrial cells under pro-inflammatory conditions. *Cytokine* 20(6), 289-294
- CDC CENTERS FOR DISEASE CONTROL (1992). 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR* 41, RR-17
- CHEN R, QUINONES-MATEU ME, MANSKY ML (2004) Drug resistance, virus fitness and HIV-1 mutagenesis. *Curr Pharm Dess* 10(32), 4065-4070
- CHOE H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, WU L, MACKAY CR, LAROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85(7), 1135-1148

- CHUN TW, CARRUTH L, FINZI D, SHEN X, DIGIUSEPPE JA, TAYLOR H, HERMANKOVA M, CHADWICK K, MARKOLICK J, QUINN TC, KUO YH, BROOKMEYER R, ZEIGER MA, BARDITCH-CROVO P, SILICIANO RF (1997) Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387(6629), 183-188
- CLARK SJ, SAAG MS, DECKER WD, CAMPBELL-HILL S, ROBERSON JL, VELDKAMP PJ, KAPPES JC, HAHN BH, SHAW GM(1991) High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 324 (14), 954-960
- CLAVEL F, GUETARD D, BRUN-VEZINET F, CHAMARET S, REY MA, SANTOS-FERREIRA O (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343
- COFFIN JM (1990) Retroviridae and their replication. *Fundamental Virology*, ed.: Fields BN, Knipe DM et al. Raven Press, Ltd., New York
- COLLINS KL, CHEN BK, KALAMS SA, WALKER BD, BALTIMORE D (1998) HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T Lymphocytes. *Nature* 391(6665), 397-401
- COMPANS RW, DIMMOCK NJ, MEIER-EWERT H (1969) Effect of antibody to neuraminidase on the maturation and hemagglutinating activity of an influenza A2 virus. *J Virol* 4, 528-534
- CORDELL JL, FALINI B, ERBER WN, GHOSH AK, ABDULAZIZ Z, McDONALD S, PULFORD KAF, STEIN H, MASON DJ (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32, 219-229
- CRAWFORD S, GOFF SP (1985) A deletion mutation in the 5' part of the pol gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins. *J Virol* 53(3), 899-907
- CURTIS BM, SCHARNOWSKE S, WATSON AJ (1992) Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8356-8360
- DALGLEISH AG, BEVERLY PC, CLAPHAM PR, CRAWFORD DH, GREAVES MF, WEISS RA (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312(5996), 763-767
- DENG HK, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARZIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL CM, DAVIS CB, PEIPER SC, SCHALL TJ, LITTMAN DR, LANDAU NR (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-666
- DEVITO C, BROLIDEN K, KAUL R, SVENSSON L, JOHANSEN K, KIAMA P, KIMANI J, LOPALCO L, PICONI S, BWAYO JJ, PLUMMER F, CLERICI M, HINKULA J (2000) Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol* 165, 5170-5176
- DOMS RW, PEIPER SC (1997) Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses Chemokines receptors for cellular entry. *Virology* 235(2), 179-190

- DORANZ BJ, RUCKER J, YI Y, SMYTH RJ, SAMSON M, PEIPER SC, PARMENTIER M, COLLMAN RG, DOMS RW (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149
- DORFMAN T, MAMMANO F, HASELTINE WA, GOTTLINGER HG (1994) Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 68(3), 1689-1696
- DOYLE C, STROMINGER JL (1987) Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330(6145), 256-259
- DRAGIC T, LITWIN V, ALLAWAY GP, MARTIN SR, HUANG Y, NAGASHIMA KA, CAYANAN C, MADDON PJ, KOUP RA, MOORE JP, PAXTON WA (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673
- EARL PL, DOMS RW, MOSS B (1990) Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2), 648-652
- ENDRES MJ, CLAPHAM PR, MARSH M, AHUJA M, TURNER JD, MCKNIGHT A, THOMAS JF, STOEBEAU-HAGGARTY B, CHOE S, VANCE PJ, WELLS TN, POWER CA, SUTTERWALA SS, DOMS RW, LANDAU NR, HOXIE JA (1996) CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87(4), 745-756
- ESHLEMAN SH, HOOVER DR, SHU CHEN, HUDELSON SE, GUAY LA, MWATHA A, FISCUS SA, MMIRO F, MUSOKE P, JACKSON JB, KUMWENDA N, TAHA TAHA (2005) Nevirapine (NVP) resistance in women with HIV-1 subtype C, compared with subtypes A and D, after the administration of single-dose NVP. *J Inf Dis* 192, 30-36
- FARNET CM, HASELTINE WA (1991) Determination of viral proteins in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* 64(4), 1910-1915
- FAUCI AS, POLI G (1993) Cytokine modulation of HIV expression. *Semin Immunol* 5(3), 165-173
- FENG Y, BRODER CC, KENNEDY PE, BERGER EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877
- FIEBIG EW, WRIGHT DJ, RAWAL BD, GARRETT PE, SCHUMACHER RT, PEDDADA L, HELDEBRANT C, SMITH R, CONRAD A, KLEINMAN SH, BUSCH MP (2003) Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17, 1871-1879
- FLYS T, NISSLEY DV, CLAASEN CW, JONES D, CHANJUAN SHI, GUAY LA, MUSOKE P, MMIRO F, STRATHERN JN, JACKSON JB, ESHLEMAN JR, ESHLEMAN SH (2005) Sensitive drug-resistance assays reveal long-term persistence of HIV-1 variants with the K103N Nevirapine (NVP) resistance mutation in some women and infants after the administration of single-dose NVP: HIVNET012. *J Inf Dis* 192, 24-29

- FRANKE EK, YUAN HE, LUBAN J (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372(6504), 359-362
- GALLAY P, SWINGLER S, AIKEN C, TRONO D (1995) HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80(3), 379-388
- GALLO RC, SARIN PS, GELMANN EP, GELMANN EP, ROBERT-GUROFF M, RICHARDSON E, KALYANARAMAN VS, MANN D, SIDHU GD, STAHL RE, ZOLLA-PAZNER S, LEIBOWITCH J, POPOVIC M (1983) Isolation of human T cell leukemia in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865
- GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, SHEARER GM, KAPLAN M, HAYNES BF, PALKER TJ, REDFIELD R, OLESKE J, SAFAI B ET AL. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503
- GARCIA PM, KALISH LA, PITT J, MINKOFF H, QUINN TC, BURCHETT SK, KORNEGAY J, JACKSON B, MOYE J, HANSON C, ZORRILLA C, LEW JF (1999) Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 341(6), 394-402
- GEIJTENBEEK TB, KWON DS, TORENSMA R, VAN VLIET SJ, VAN DUINHOVEN GC, MIDDEL J, CORNELISSEN IL, NOTTET HS, KEWALRAMANI VN, LITTMAN DR, FIGDOR CG, VAN KOOYK Y (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597
- GELDERBLOM HR (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function [editorial]. *AIDS* 5(6), 617-637
- GELDERBLOM HR, HAUSMANN EH, ÖZEL M, PAULI G, KOCH MA (1987) Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156(1), 171-176
- GELDERBLOM HR, REUPKE H, WINKEL T, KUNZE R, PAULI G (1987 II) MHC-antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z Naturforsch [C]* 42(11-12), 1328-1334
- GENDELMAN HE, ORENSTEIN JM, BACA LM, WEISER B, BURGER H, KALTER DC, MELTZER MS (1989) The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS* 3(8), 475-495
- GORTMAKER SL, HUGHER M, CERVIA J, BRADY M, JOHNSON GM, SEAGE GR 3RD, SONG LY, DANKNER WM, OLESKE JM; PEDIATRIC AIDS CLINICAL TRIALS GROUP PROTOCOL 219 TEAM (2001) Effect of combination therapy including protease inhibitors on mortality among children and adolescents infected with HIV-1. *N Engl J Med* 345(21), 1522-1528
- GROSCH-WÖRNER I, KOCH S, VOCKS M, SCHAFER A, MIELKE M, WAHN U, ZORR B, MAAS U (1989) HIV-Infektion bei Kindern seropositiver Mütter (HIV infection in children of seropositive mothers). *Arch Gyn Obstet* 245(1-4), 185-188
- GUAY LA, MUSOKE P, FLEMING T, BAGENDA D, ALLEN M, NAKABIITO C, SHERMAN J, BAKAKI P, DUCAR C, DESEYVE M, EMEL L, MIROCHNICK M, FOWLER MG, MOFENSON L, MIOTTI P, DRANSFIELD K, BRAY D, MMIRO F, JACKSON JB (1999) Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with

- zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 354, 795-802
- HAMED KA, WINTERS MA, HOLODNIY M, KATZENSTEIN DA, MERIGAN TC (1993) Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen: effects of disease stage and nucleoside therapy. *J Infect Dis* 167, 798-802
- HANSEN GH, NIELS-CHRISTIANSEN LL, IMMERDAL L, HUNZIKER W, KENNY AC, DANIELSEN EM (1999) Transcytosis of immunoglobulin A in the mouse enterocyte occurs through glycolipid raft- and rab17-containing compartments. *Gastroenterology* 116, 610-622
- HANSEN WR, KEELAN JA, SKINNER SJ, MITCHELL MD (1999) Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissues: a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 57, 243-257
- HARDT O (2000) Nachweis der PND-spezifischen Immunantwort gegen HIV-1 gp120: Herstellung von Oligopeptiden, die sich aus der PND-Region ableiten, und Etablierung von ELISA-Testen. Dissertation, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin
- HARRIS M (1999) HIV: a new role for Nef in the spread of HIV. *Curr Biol* 9(12), R459-461
- HEINZINGER NK, BUKINSKY MI, HAGGERTY SA, RAGLAND AM, KEWALRAMANI V, LEE MA, GENDELMANN HE, RATNER L, STEVENSON M, EMERMAN M (1994) The Vpr Protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(15), 7311-7315
- HENDERSON LE, BOWERS MA, SOWDER RC 2ND, SERABYN SA, JOHNSON DG, BESS JW JR, ARTHUR LO, BRYANT DK, FENSELAU C (1992) Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol* 66(4), 1856-1865
- HERTELENDY F, ROMERO R, MOLNAR M, TODD H, BALDASSARE JJ (1993) Cytokine-initiated signal transduction in human myometrial cells. *Am J Reprod Immunol* 30, 49-57
- HOCINI H, BÉLEC L, ISCAKI S, GARIN B, PILLOT J, BECQUART P, BOMSEL M (1997) High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: Contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Human Retroviruses* 13(14), 1179-1185
- HOCINI H, BOMSEL M (1999) Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis* 179, 448-453
- HOCINI H, BECQUART P, BOUHLAL H, CHOMONT N, ANCUTA P, KAZATCHKINE MD, BÉLEC L (2001) Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. *J Virol* 75(11), 5370-5374

- HOFMANN-LEHMANN R, VLASAK J, RASMUSSEN RA, JIANG S, LI PL, BABA LW, MONTEFIORE DC, BERNACKY BJ, RIZVI TA, SCHMIDT R, HILL LR, KEELING ME, KATINGER H, STIEGLER G, CAVACINI LA, POSNER MR, RUPRECHT RM (2002) Postnatal pre- and post-exposure passive immunization strategies: protection of neonatal macaques against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J Med Primatology* 31, 109-119
- HOXIE JA (1991) Hypothetical assignment of intrachain disulfide bonds for HIV-2 and SIV envelope glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 7, 495-500
- JOAG SV, ADANYI I, LI Z, FORESMAN L, PINSON DM, WANG C, STEPHENS EB, RAGHAVAN R, NARAYAN O (1997) Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS. *J Virol* 71(5), 4016-4023
- JAVAHERIAN K, LANGLOIS AJ, MCDANAL C, ROSS KL, ECKLER LI, JELLIS CL, PROFY AT, RUSCHE JR, BOLOGNESI DP, PUTNEY SD ET AL (1989) Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(17), 6768-6772
- JOHNSON JA, LI J, MORRIS L, MARTINSON N, GRAY G, MCINTYRE J, HENEINE W (2005) Emergence of drug-resistant HIV-1 after intrapartum administration of single-dose Nevirapine is substantially underestimated. *J Inf Dis* 192, 16-23
- KAERBER G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 162, 480
- KAGE A, SHOOLIAN E, ROKOS K, ÖZEL M, NUCK R, REUTTER W, KÖTTGEN E, PAULI G (1998) Epithelial uptake and transport of cell-free human immunodeficiency virus type 1 and gp120-coated microparticles. *J Virol* 72(5), 4231-4236
- KALLMAN J, KIHLSSTROM E (1997) Penetration of group B streptococci through polarized Madin Darby canine kidney cell. *Pediatr Res* 42, 799-804
- KIESSLING AA, LAMPARELLI N, YIN HZ, SEIBEL MM, EYRE RC (1995) Semen leucocytes: friends or foes? *Fertil Steril* 64, 196-198
- KIESSLING AA, FITZGERALD LM, ZHANG D, CHHAY H, BRETTLER D, EYRE RC, STEINBERG J, MCGOWAN K, BYRN RA (1998) Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (1), 33-41
- KINOSHITA T (1991) Biology of complement: the overture. *Immunol Today* 12(9), 291-295
- KIRCHNER JT (1999) Maternal HIV levels correlate with perinatal transmission. *Am Fam Physician* 60(9), 2684-2687
- KLATZMANN D, CHAMPAGNE E, CHAMARET S, GRUEST J, GUETARD D, HERCEND T, GLUCKMAN JC, MONTAGNIER L (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312(5996), 767-768

- KLIMKAIT T, STREBEL K, HOGGAN MD, MARTIN MA, ORENSTEIN JM (1990) The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64(2), 621-629
- KRIEGER JN, COOMBS RW, COLLIER AC, ROSS SO, CHALOUPKA K, CUMMINGS DK, MURPHY VL, COREY L (1991) Recovery of human immunodeficiency virus type 1 from semen: minimal impact of stage of infection and current antiviral chemotherapy. *J Infect Dis* 163(2), 386-388
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- LAGAYE S, DERRIEN M, MENU E, COITO C, TRESOLDI E, MAUCLÈRE P, SCARLATTI G, CHAHOUT G, BARRÉ-SINOUSSE F, BOMSEL M, THE EUROPEAN NETWORK FOR THE STUDY OF IN UTERO TRANSMISSION OF HIV-1 (2001) Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasiespecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* 75(10), 4780-4791
- LANDESMAN SH, KALISH LA, BURNS DN, MINKOFF H, FOX HE, ZORRILLA C, GARCIA P, FOWLER MG, MEFENSON L, TUOMALA R (1996) Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. *N Engl J Med* 334(25), 1618-1623
- LASKY LA, NAKAMURA G, SMITH DH, FENNIE C, SHIMASAKI C, PATZER E, BERMAN P, GREGORY T, CAPON DJ (1987) Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50(6), 975-985
- LEE CN, ROBINSON J, MAZZARA G, CHENG YL, ESSEX M, LEE TH (1995) Contribution of hypervariable domains to the conformation of a broadly neutralizing glycoprotein gp120 epitope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 777-781
- LEONARD CK, SPELLMAN MW, RIDDLE L, HARRIS RJ, THOMAS JN, GREGORY TJ (1990) Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265, 10373-10382
- LI A, BABA TW, SODROSKI J, ZOLLA-PAZNER S, GORNY MK, ROBINSON J, POSNER MR, KATINGER H, BARBAS III CF, BURTON DR, CHOU TC, RUPRECHT RM (1997) Synergistic neutralization of a chimeric SIV/ HIV type 1 virus with combinations of human anti-HIV type 1 envelope monoclonal antibodies or hyperimmune globulins. *AIDS Res Human Retroviruses* 13, 647-656
- LI A, KATINGER H, POSNER MR, CAVACINI L, ZOLLA-PAZNER S, GORNY MK, SODROSKI J, CHOU TC, BABA TW, RUPRECHT RM (1998) Synergistic neutralization of simian-human immunodeficiency virus SHIV-vpu+ by triple and quadruple combinations of human monoclonal antibodies and high-titer anti-human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulins. *J Virol* 72, 3235-3240

- LIUZZI G, CHIRIANNI A, CLEMENTI M, BAGNARELLI P, VALENZA A, CATALDO PT, PIAZZA M (1996) Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS 10(14)*, F51-56
- LU Y, BROSIO P, LAFAILE M, LI J, COLLMAN RG, SODROSKI J, MILLER CJ (1996) Vaginal transmission of chimeric simian/human immunodeficiency viruses in rhesus macaques. *J Virol 70(5)*, 3045-3050
- LUNDIN-SCHILLER S, MITCHELL MD (1991) Prostaglandin production by human chorion leave cells on response to inflammatory mediators. *Placenta 12*, 353-363
- MADDON PJ, DALGLEISH AG, MCDUGAL JS, CLAPHAM PR, WEISS RA, AXEL R (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell 47(3)*, 333-348
- MASCOLA JR, LOUDER MK, VANCOTT TC, SAPAN CV, LAMBERT JS, MUENZ LR, BUNOW B, BIRX DL, ROBB ML (1997) Potent and synergistic neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by hyperimmune anti-HIV immunoglobulin combined with monoclonal antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol 71*, 7198-7206
- MASCOLA JR, LEWIS MG, STIEGLER G, HARRIS D, VANCOTT TC, HAYES D, LOUDER MK, BROWN CR, SAPAN CV, FRANKEL SS, LU Y, ROBB ML, KATINGER H, BIRX DL (1999) Protection of Macaques against pathogenic simian/ human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol 73*, 4009-4018
- MASCOLA JR, STIEGLER G, VANCOTT TC, KATINGER H, CARPENTER CB, HANSON CE, BEARY H, HAYES D, FRANKEL SS, BIRX DL, LEWIS MG (2000) Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/ SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med 6*, 207-210
- MAYAUX MJ, DUSSAIX E, ISOPET J, REKACEWICZ C, MENDELBROT L, CIRARU-VIGNERON N, ALLEMON MC, CHAMBRIN V, KATLAMA C, DELFRAISSY JF, PUEL J (1997) Maternal virus load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohort studies. SEROGEST Cohort Group. *J Infect Dis 175(1)*, 172-175
- MCCUNE JM, RABIN LB, FEINBERG MB, LIEBERMAN M, KOSEK LC, REYES GR, WEISSMAN IL (1988) Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell 53(1)*, 55-67
- MCDUGAL JS, MADDON PJ, DALGLEISH AG, CLAPHAM PR, LITTMAN DR, GODFREY M, MADDON DE, CHESS L, WEISS RA, AXEL R (1986) The T4 glycoprotein is a cell-surface receptor for the AIDS virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 51 Pt 2*, 703-711
- MEIER C, OELSCHLAEGER TA, MERKERT H, KORHONEN TK, HACKER J (1996) Ability of Escherichia coli isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect Immun 64*, 2391-2399

- MERMIN JH, HOLODNIY M, KATZENSTEIN DA, MERIGAN TC (1991) Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 164, 769-776
- MITCHELL MD, EDWIN S, ROMERO RJ (1990) Prostaglandin biosynthesis by human decidual cells: effects of inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukotriens EFA* 41, 35-38
- MODROW S, HAHN BH, SHAW GM, GALLO RC, WONG-STAAAL F, WOLF H (1987) Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable domains. *J Virol* 61, 570-578
- MOSES AV, NELSON JA (1994) HIV infection of human brain capillary endothelial cells-implications for AIDS dementia. *Adv Neuroimmunol* 4, 239-247
- MULLIS KB, FALCOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, EHRLICH P (1986) Specific enzymatic amplification in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51, 263-273
- MURPHY PM (1996) Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7(1), 47-64
- MUSTER T, STEINDL F, PURTSCHER M, TRKOLA A, KLIMA A, HIMMLER G, RUKER F, KATINGER H (1993) A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67, 6642-6647
- NIEDRIG M, HARTHUS HP, BROKER M, MELEON R, GELDERBLOM H, PAULI G (1993) Characterization of murine monoclonal antibodies directed against the submembrane protein p17 of HIV-1. *Hybridoma* 12(4), 431-439
- NIZET V, KIM KS, STINS M, JONAS M, CHI EY, NGUYEN, RUBENS CE (1997) Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* 65, 5074-5081
- OBERLIN E, AMARA A, BACHELERIE F, BESSIA C, VIRELIZIER JL, ARENZANA-SEISDEDOS F, SCHWARTZ O, HEARD JM, CLARK-LEWIS I, LEGLER DF, LOETSCHER M, BAGGIOLINI M, MOSER B (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382(6594), 833-835
- OLSEN G, SHIELDS J (1984) Seminal lymphocytes, plasma and AIDS. *Nature* 309, 116-117
- ORENSTEIN JM, MELTZER MS, PHIPPS T, GENDELMAN HE (1988) Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor 1-treated human monocytes: an ultrstructural study. *J Virol* 62(8), 2578-2586
- PANIGRAHI P, BAMFORD P, HORVATH K, MORRIS JG, GEWOLB IH (1996) Escherichia coli transcytosis in a Caco-2 cell model: implications in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 40, 415-421
- PARKER CE, DETERDING LJ, HAGER-BRAUN C, BINLEY JM, SCHÜLKE N, KATINGER H, MOORE JP, TOMER KB (2001) Fine definition of the epitop on the gp41 Glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for neutralizing monoclonal Antibody 2F5. *J Virol* 75(22), 10906-10911

- PEDROZA MARTINS L, CHENCINER N, WAIN-HOBSON S (1992) Complex intrapatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology* *191*, 837-845
- PITT J, HENRARD D, FITZGERALD G, MOFENSON L, LEW J, HILLYER G, MENDEZ H, COOPER E, HANSON C, RICH KC (2000) Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 antibodies in perinatal HIV-1 infection: association with human HIV-1 transmission, infection and disease progression. For the Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* *182*(4), 1243-1246
- PÖHLMANN S, SOILLEUX EJ, BARIBAUD F, LESLIE G, MORRIS LS, TROWSDALE J, LEE B, COLEMAN N, DOMS RW (2001) DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 2670-2675
- POLLARD SR, ROSA MD, ROSA JJ AND WILEY DC (1992) Truncated variants of gp120 bind CD4 with high affinity and suggest a minimum CD4 binding region. *EMBO J* *11*(2), 585-591.
- POLLARD JK, MITCHELL MD (1996) Intrauterine infection and the effects of inflammatory mediators on prostaglandin production by myometrial cells from pregnant woman. *Am J Obstet Gynecol* *174*, 682-686
- PURTSCHER M, TRKOLA A, GRUBER G, BUCHACHER A, PREDL R, STEINDL F, TAUER C, BERGER R, BARRET N, JUNGBAUER A ET AL. (1994) A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Research in Human Retroviruses* *10*, 1651-1658
- PURTSCHER M, TRKOLA A, GRASSAUER A, SCHULZ PM, KLIMA A, DÖPPER S, GRUBER G, BUCHACHER A, MUSTER T, KATINGER H (1996) Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS* *13*, 137-162
- QUAYLE AJ, XU C, MAYER KH, ANDERSON DJ (1997) T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* *176*(4), 960-968
- REED LJ & MUENCH HA (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. Journal Hyg.* *27*, 493
- REIL H, KOLLMUS H, WEIDLE UH, HAUSER H (1993) A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J Virol* *67*(9), 5579-5584
- RESNICK L, BERGER JR, SHAPSHAK P, TOURTELLOTTE WW (1988) Early penetration of the blood-brain-barrier by HIV. *Neurology* *38*(1), 9-14
- RIETVELD A, SIMONS K (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochem. Biophys. Acta* *1376*, 467-479
- ROKOS K, WANG H, SEEGER J, SCHÄFER A, PAULI G (1998) Transport of viruses through fetal membranes: an in vitro model of perinatal transmission. *J Med Virol* *54*, 313-319

- ROMERO R, DURUM S, DINARELLO CA, OYARZUN E, HOBBS JC, MITCHELL MD (1989) Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins* 37, 13-22
- ROSEN CA, SODROSKI JG, HASELTINE WA (1985) Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6502-6506
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY
- SANDERS RW, VENTURI M, SCHIFFNER L, KALYANARAMAN R, KATINGER H, LLOYD KO, KWONG PD, MOORE JP (2002) The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* 76(14), 7293-7305
- SANGER F, NICKLEN S, COULSEN AR (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24, 104-108
- SCALAN CN, PANTOPHLET R, WORMALD MR, OLLMANN SAPHIRE E, STANFIELD R, WILSON IA, KATINGER H, DWEK RA, RUDD PM, BURTON DR (2002) The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of $\alpha 1 \rightarrow 2$ mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* 76(14), 7306-7321
- SCHMIDT W (1992) The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 127, 1-100
- SEEGER J (2003) Transport von Viren durch Epithelzellen: Modellsystem für intrauterine Infektion und zur Virusübertragung über Schleimhäute. Dissertation, Humboldt Universität, Berlin
- SEMBA RD, MIOTTI PG, CHIPHANGWI JD, SAAH AJ, CANNER JK, DALLABETTA GA, HOOVER DR (1994) Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 343(8913), 1593-1597
- SIMONS K, VAN MEER G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202
- SODORA DL, LEE F, DAILEY PJ, MARX PA (1998) A genetic and viral load analysis of the simian immunodeficiency virus during the acute phase in macaques inoculated by the vaginal route. *AIDS Res Human Retroviruses* 14, 171-181
- SOILLEUX EJ, BARTEN R, TROWSDALE J (2000) DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol* 165, 2937-2942
- SOILLEUX EJ, COLEMAN N (2003) Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins. *IJBCB* 35, 283-287
- SOUTH TL, BLAKE PR, SOWDER RC 3RD, ARTHUR LO, HENDERSON LE, SUMMERS MF (1990) The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles binds zinc and forms retroviral-type zinc fingers. *Biochemistry* 29(34), 7786-7789

- STARCICH BR, HAHN BH, SHAW GM, MCNEELY PD, MODROW S, WOLF H, PARKS ES, PARKS WP, JOSEPHS SF, GALLO RC, WONG-STAAAL F (1986) Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45, 637-648
- STIEGLER G, ARMBRUSTER C, VCELAR B, STOIBER H, KUNERT R, MICHAEL NL, JAGODZINSKI, AMMANN C, JÄGER W, JACOBSON J, VETTER N, KATINGER H (2002) Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase 1 evaluation. *AIDS* 16, 2019-2025
- SUTTHENT R, FOONGLADDA S, CHEARSKUL S, WANAPRAPA N, LIKANONSKUL S, KOSITANONT U, RIENGROJPITAK S, SAHAPONG S, WASI C ET AL. (1997) Maternal and viral factors in vertical transmission of HIV-1 subtype E. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28(4), 689-698
- TERWILLIGER EF, COHEN EA, LU YC, SODROSKI JG, HASELTINE WA (1989) Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(13), 5163-5167
- TOMLINSON MJ, WHITE A, BARRATT CL, BOLTON AE, COOKE ID (1992) The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum Reprod* 7, 517-522
- TRAVIS BM, DYKERS TI, HEWGILL D, LEDBETTER J, TSU TT, HU SL, LEWIS JB (1992) Functional roles of the V3 hypervariable region of HIV-1 gp160 in the processing of gp160 and in formation of syncytia in CD4+ cells. *Virology* 186, 313-317
- TRKOLA A, PURTSCHER M, MUSTER T, BALLAUN C, BUCHACHER A, SULLIVAN N, SRINIVASAN K, SODROSKI J, MOORE JP, KATINGER H (1996) Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70, 1100-1108
- VARMUS H, SWANSTROM R (1991) Replication of retroviruses. Weiss R, Teich N, Varmus H et al. eds. *RNA tumor viruses: molecular biology of tumor viruses*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratories, 369-512
- VERKADE P, HARDER T, LAFONT F, SIMONS K (2000) Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Mardin-Darby canine kidney cells. *J. Cell. Biol.* 148, 727-739
- VON DER HELM K (1996) Retroviral proteases: structure, function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy. *Biol Chem* 377(12), 765-74
- WAIN-HOBSON S, SONIGO P, DANOS O, COLE S, ALIZON M (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40(1), 9-17
- WILEY CA, SCHRIER RD, NELSON JA, LAMPERT PW, OLDSTONE MBA (1986) Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7089-7093
- WILLEY RL, RUTLEDGE RA, DIAS S, FOLKS T, THEODORE T, BUCKLER CE, MARTIN MA (1986) Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5038-5042

- WILLEY RL, MALDARELLI F, MARTIN MA, STREBEL K (1992) Human Immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66(1), 226-234
- WOLBANK S, KUNERT R, STIEGLER G, KATINGER H (2003) Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol* 77(7), 4095-4103
- XU W, SMITH-FRANKLIN BA, LI PL, WOOD C, HE J, DU Q, BHAT GJ, KANKASA C, KATINGER H, CAVACINI LA, POSNER MR, BURTON DR, CHOU TC, RUPRECHT RM (2001) Potent neutralization of primary human immunodeficiency virus clade C isolates with a synergistic combination of human monoclonal antibodies raised against clade B. *J Hum Virol* 4, 55-61
- YU X, YUAN X, MATSUDA Z, LEE TH, ESSEX M (1992) The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J Virol* 66(8), 4966-4971
- ZACK JA, ARRIGO SJ, WEITSMAN SR, GO AS, HAISLIP A, CHEN IS (1990) HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61(2), 213-222

Anhang

Tab. 28: Aminosäuresequenzen der Peptide ARP740

Peptid-Nummer	Aminosäuresequenz	Peptid-Nummer	Aminosäuresequenz
ARP740.1	ATEKLWVTVYYGVPVWKEATT	ARP740.24	NGSLAEEEEVVIRSVNFTDNA
ARP740.2	VPVWKEATTTLFCASDAKAY	ARP740.25	RSVNFTDNAKTIIVQLNTS
ARP740.3	LFCASDAKAYDTEVHNVWAT	ARP740.26	VQLNTSVEINCTR
ARP740.4	DTEVHNVWATHACVPTDPN	ARP740.27	VEINCTRPNNNTRKRIRIQ
ARP740.5	HACVPTDPNPQEVVLNVNTE	ARP740.28	NTRKRIRIQRGPGRAFVTIG
ARP740.6	PQEVVLNVNTEFDMWKNDMV	ARP740.29	RGPGRFVTIGKIGNMRQA
ARP740.7	NFDMWKNDMVEQMHEDIISL	ARP740.30	KIGNMRQAHCNISRAKWNT
ARP740.8	EQMHEDIISLWDQSLKPCVK	ARP740.31	HCNISRAKWNTLQKIDSKL
ARP740.9	WDQSLKPCVKLTPLCVSLK	ARP740.32	LKQIDSKLREQFGNNKTIIF
ARP740.10	LTPLCVSLKCTDLKNDNTN	ARP740.33	REQFGNNKTIIFKQSSGGDPE
ARP740.11	CTDLKNDNTNSSSGRMIMEK	ARP740.34	KQSSGGDPEIVTHSFNCGGE
ARP740.12	SSSGRMIMEKGEIKNCSFNI	ARP740.35/6	GEFFYCNSTQLFNS
ARP740.13	GEIKNCSFNISTSIRGKVQK	ARP740.37	NSTWFNSTWSTEGSNNTSGS
ARP740.14	STSIRGKVQKEYAFFYKLDI	ARP740.38	TEGSNNTEGSDTITLPCRI
ARP740.15	EYAFFYKLDIIPIDNDTTSY	ARP740.39	DTITLPCRIKQIINMWQKVG
ARP740.16	IPIDNDTTSYSLTSCNTSVI	ARP740.40	KQIINMWQKVGKAMYAPPIS
ARP740.17	SLTSCNTSVITQACPKVSFE	ARP740.41	KAMYAPPISGQIRCSSNITG
ARP740.18	TQACPKVSFEPIPIHYCAPA	ARP740.42	GQIRCSSNITGLLLTRDGGNS
ARP740.19	PIPIHYCAPAGFAILKCNK	ARP740.43	LLLTRDGGNSNNESEIFRLG
ARP740.20	GFAILKCNKTFNGTGPCT	ARP740.44	NNESEIFRLGGGDMRDNWS
ARP740.21	TFNGTGPCTNVSTVQCTHGI	ARP740.45	GGDMRDNWRSELYKYKVVKI
ARP740.22	VSTVQCTHGIRPVVSTQLLL	ARP740.46	ELYKYKVVKIEPLGVAPTKA
ARP740.23	RPVVSTQLLLNGSLAEEVV	ARP740.47	EPLGVAPTKAKRRVVQREKR

Tab. 29: Ergebnisse der Transzytoseversuche mit unterschiedlichen Subtypen der HIV-1 Gruppe M und HIV-1 Gruppe O in Anwesenheit von Env362-420.

		Transzytose (%)	Inhibierung (%)
HIV-1 Gruppe M Subtyp A Referenzisolat 11562/96			
Viruskontrolle	$6,6 \times 10^5$	—	—
Kontrollversuch	$2,0 \times 10^4$	100	0
Peptid	$6,5 \times 10^3$	33	67
HIV-1 Gruppe M Subtyp C Referenzisolat 484/97			
Viruskontrolle	$2,5 \times 10^6$	—	—
Kontrollversuch	$1,0 \times 10^5$	100	0
Peptid	$2,3 \times 10^4$	23	77
HIV-1 Gruppe M Subtyp DI Referenzisolat 3971/95			
Viruskontrolle	$7,1 \times 10^6$	—	—
Kontrollversuch	$1,2 \times 10^4$	100	0
Peptid	$7,8 \times 10^3$	65	35
HIV-1 Gruppe M Subtyp DII Referenzisolat 92UG024			
Viruskontrolle	$2,5 \times 10^7$	—	—
Kontrollversuch	$5,2 \times 10^2$	100	0
Peptid	$2,2 \times 10^2$	42	58
HIV-1 Gruppe M Subtyp F Referenzisolat 93BR020			
Viruskontrolle	$8,0 \times 10^5$	—	—
Kontrollversuch	$4,2 \times 10^4$	100	0
Peptid	$9,6 \times 10^3$	23	77
HIV-1 Gruppe M Subtyp G Referenzisolat ARP/173 RU570			
Viruskontrolle	$1,3 \times 10^3$	—	—
Kontrollversuch	$2,3 \times 10^1$	100	0
Peptid	0	<43	>57
HIV-1 Gruppe O Referenzisolat HIV-1 CA-9			
Viruskontrolle	$4,3 \times 10^6$	—	—
Kontrollversuch	$5,6 \times 10^1$	100	0
Peptid	$2,0 \times 10^1$	36	64

Mittelwerte von mindestens drei Versuchen, Auswertung über HIV-1 Gruppe M und HIV-1 Gruppe O *env*-TaqMan™-PCR.

Tab. 30: Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren

Name	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Cystein	Cys	C
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Tyrosin	Tyr	Y
Tryptophan	Trp	W
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K
Arginin	Arg	R

Tab. 31: Studienkollektiv Verlaufsseren.

Studienkollektiv	Patient	Extinktion im Peptid-ELISA	IgG-Konzentration [g/l]	Korrekturfaktor	Korrigierte Extinktion
AIDS	A	0,558	22,7	0,7	0,391
		0,483	21,0	0,76	0,367
		0,441	21,3	0,75	0,331
	B	0,495	26,0	0,62	0,307
		0,492	26,0	0,62	0,305
		0,49	20,0	0,80	0,392
	F	0,059	14,0	1,14	0,067
		0	13,0	1,23	0
		0,095	16,0	1,00	0,095
	G	0,578	42,1	0,38	0,219
		0,784	29,6	0,40	0,314
		1,305	46,8	0,34	0,444
	O	0,47	21,0	0,76	0,357
		0,615	23,0	0,70	0,431
		0,523	21,0	0,76	0,398
	P	0,295	14,9	1,07	0,316
		0,39	18,1	0,88	0,343
		0,261	17,4	0,92	0,240
	Q	0,399	18,0	0,88	0,351
		0,483	19,0	0,84	0,406
		0,515	22,0	0,73	0,376
	U	0,278			
		0,671	35,0	0,46	0,309
		1,017	34,0	0,47	0,478
	V	0,356	24,0	0,67	0,239
		0,763	18,1	0,88	0,671
		0,591	19,1	0,84	0,496
	b	0,806	24,3	0,66	0,532
		0,486	23,7	0,68	0,331
		0,720	22,9	0,67	0,482

Stadien- progression	C	0,203			
		0,520	32,1	0,50	0,260
		0,888	62,0	0,26	0,231
	E	0,149	15,8	1,01	0,150
		0,458	17,9	0,89	0,408
			15,2	1,05	
	H	0,38	22,0	0,72	0,274
		0,198	24,0	0,67	0,133
		0,564	29,0	0,55	0,310
	I	0,590	25,1	0,64	0,378
		0,638	36,9	0,43	0,274
		0,432	29,2	0,55	0,238
	M	0,62	20,0	0,80	0,496
		0,322	21,0	0,76	0,245
		0,404	25,0	0,64	0,259
	W	0,513	23,0	0,69	0,354
		0,360	19,0	0,84	0,302
		0,255	22,0	0,73	0,186
	Z	0,027	18,5	0,86	0,023
		0,540	22,6	0,71	0,383
		0,018	16,1	1,00	0,018
	a	0,077	27,0	0,59	0,045
		0,491	30,0	0,53	0,260
		0,540	27,0	0,59	0,319
	c	1,350	23,0	0,70	0,945
		0,783	20,0	0,80	0,626
		0,117	19,0	0,84	0,098
Latenz	N	0,119	17,6	0,90	0,107
		0,546	26,7	0,60	0,328
		0,404	22,8	0,70	0,283
	R	0,332	15,4	1,04	0,345
		0,372	15,2	1,05	0,391
		0,109	15,8	1,01	0,110

Latenz	Y	0,285	25,0	0,64	0,182
		0,206			
		0,206	9,4	1,70	0,650
	e	0,099	21,0	0,76	0,075
		0,765	23,0	0,67	0,507
		0,441	25,3	0,63	0,278
LAS/ARC	K	0,177			
		0,657	25,0	0,64	0,420
		0,748	25,0	0,64	0,479
	L	0,642	29,6	0,54	0,347
		0,644	30,0	0,53	0,341
		0,736	31,0	0,52	0,382
	X	0,407	23,3	0,67	0,273
		0,254	18,1	0,88	0,224
		0,723	21,2	0,75	0,542

Angabe der ermittelten Extinktionen im Peptid-ELISA, der IgG-Konzentration im Serum, der errechneten Korrekturfaktoren (bezogen auf 16g/l IgG) und der korrigierten Extinktionen. Daten entnommen aus Hardt 2000.

Tab. 32: Studienkollektiv dokumentierte Serokonversionen.

Patient	Probennummer	Abnahme nach x Wochen	Western Blot				ELISA		Stadium	Reaktivität im Peptid-ELISA
			p24 Ak	gp41 Ak	gp120 Ak	gp160 Ak	1.	2.		
A-E	A	0	(+)	-	-	-	-	-	I-II	-
	B	2	+	-	-	-	-	-	II-III	-
	C	3	+	(+)	(+)	(+)	+	+	III	-
	D	7	+	(+)	-	-	+	+	IV	-
	E	8	+	(+)	(+)	+	+	+	IV-V	-
a	1	0	+	-	(+)	+	+	+	IV	-
	2	2	+	(+)	+	+	+	+	V	-
	3	9	+	+	+	+	+	+	VI	-
	4	15	+	+	+	+	+	+	VI	-
	5	17	+	+	+	+	+	+	VI	-
	6	22	+	+	+	+	+	+	VI	-
b	1	0	-	-	-	-	-	+	III	+
	2	2	-	-	-	(+)	+	+	III	nb
	3	4	(+)	-	(+)	+	+	+	IV	-
	4	11	+	(+)	+	+	+	+	V-VI	+
	5	17	+	+	+	+	+	+	V-VI	+
	6	21	+	+	+	+	+	+	V-VI	(+)
	7	25	+	+	+	+	+	+	V-VI	-
c	1	0	-	-	-	-	?	?	II-III	+
	2	2	(+)	-	-	(+)	+	+	III	-
	3	4	(+)	?	(+)	+	+	+	III-IV	-
	4	8	+	-	+	+	+	+	IV	-
	5	11	+	(+)	+	+	+	+	V	-
	6	15	+	+	+	+	+	+	VI	-
	7	19	+	+	+	+	+	+	VI	-
d	1	0	+	(+)	(+)	+	+	+	IV	(+)
	2	2	+	(+)	+	+	+	+	V	+
	3	9	+	(+)	+	+	+	+	V	-
	4	13	+	(+)	+	+	+	+	V	-
	5	18	+	+	+	+	+	+	VI	-

d	6	20	+	+	+	+	+	+	VI	-
	7	28	+	+	+	+	+	+	VI	-
e	1	0	(+)	-	(+)	+	+	+	IV	+
	2	2	(+)	-	(+)	+	+	+	IV	-
	3	4	(+)	(+)	(+)	+	+	+	IV-V	-
	4	9	+	+	+	+	+	+	V	+
	5	14	+	+	+	+	+	+	V-VI	(+)
	6	16	+	+	+	+	+	+	V-VI	+
	7	18	+	+	+	+	+	+	V-VI	+
f	1	0	+	(+)	+	+	+	+	V-VI	-
	2	2	+	+	+	+	+	+	V-VI	+
	3	4	+	+	+	+	+	+	V-VI	-
	4	10	+	+	+	+	+	+	VI	+
	5	12	+	+	+	+	+	+	VI	+
	6	14	+	+	+	+	+	+	VI	nb
	7	16	+	+	+	+	+	+	VI	+

Angabe der Abnahmezeitpunkte, Ergebnisse der Western Blot- (Genelab[®] HIV-1 Western Blot) und ELISA- (1. BioRad HIV-ELISA, 2. Murex HIV-ELISA) Untersuchungen, Stadiumeinteilung nach Fiebig [Fiebig *et al.* 2003] und Reaktivität im Peptid-ELISA

Danksagung

Da sich eine Doktorarbeit nicht alleine schreiben lässt, möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf irgendeiner Art und Weise dabei unterstützt haben:

Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Georg Pauli für die Bereitstellung des Themas, für seine Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, seiner Diskussionsbereitschaft und seiner Hilfe beim Zusammenschreiben der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Richard Lucius für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie an der Humboldt Universität zu Berlin.

Frau Dr. Claudia Kücherer für die Bereitstellung der unterschiedlichen HIV-Isolate, der dazugehörigen Sequenzen, der unterschiedlichen Seren aus der Serenbank sowie für ihre Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Heinz Ellerbrok für seine Hilfe bei den Versuchen zur Expression von rekombinanten gp120 sowie bei der Etablierung der TaqMan-PCR-Systeme. Außerdem für seine kritischen Diskussionen und Anregungen in den Arbeitsgruppenbesprechungen.

Bei Frau Ulla Thiessen für die Einarbeitung in die Eihautpräparation und bei der Geburtshilfestation des Virchow-Klinikums, Berlin für die Möglichkeit, Eihäute für meine Versuche zu bekommen.

Bei Frau Dr. Rokos, Frau Schickhoff, Frau Blesken und Herrn Hanno von Spreckelsen für die Hilfe bei der Einarbeitung in die für mein Projekt notwendigen Labortechniken wie z.B. Zellkultur und TaqMan-PCR, sowie bei Olivia Sandmann und Sabrina Neumann für ihre Hilfe bei der Suche nach geeigneten Seren für meine Versuche.

Im Weiteren bei Olivia, Janine, Sonja, Conni, Sybille und Hanno für die amüsanten Pausen und anregenden Gesprächen (auch über fachliche Sachen), die die Zeit im Labor erst richtig schön gemacht haben.

Nicht zu vergessen bei allen übrigen Mitarbeitern von P11 und ZBS1 für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Und ganz zum Schluss noch bei den für mich wichtigsten Menschen: meiner Familie, hier insbesondere meine Eltern, und bei Rafael für ihren Glauben an mich und ihre Unterstützung und Hilfe, besonders dann, wenn nicht alles so lief, wie es laufen sollte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Maren Helwig geb. Kracht

geboren am 13. November 1971

in Wuppertal

verheiratet

Ausbildung

1982 – 1991

Gymnasium Bayreuther Strasse, Wuppertal

Abschluss: Abitur

11.1991 – 10.1993

Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin
MTA-Schule Bergmannsheil, Bochum

10.1993 – 10.1997

Studium der Biochemie/Biotechnologie an der Fachhochschule
Niederrhein in Krefeld

22.10.1997

Abschluss des Studiums als Diplom-Ingenieurin (FH)
Gesamtnote: „sehr gut“

Berufstätigkeit

11.1997 – 04.1998

Freie wissenschaftliche Mitarbeit am Robert Koch-Institut,
Fachgebiet Retrovirologie unter Leitung von Prof. Dr. G. Pauli

05.1998 – 05.1999

Technische Angestellte der Technischen Universität Berlin,
Fachbereich Biochemie unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. J. Vater im
Forschungsvorhaben „Antivirales Potential mikrobieller Tenside“

06.1999 – 03.2000

freie wissenschaftliche Mitarbeit am Robert Koch-Institut, Fachgebiet
Retrovirologie im Forschungsvorhaben „Transzytose von HIV-1 und
HSV-1 durch Epithelzellen“

04.2000 – 11.2000

Technische Angestellte am Robert Koch-Institut, Fachgebiet
Retrovirologie im Forschungsvorhaben „Transzytose von HIV-1 und
HSV-1 durch Epithelzellen“

11.2000

Beginn der Promotion mit dem Thema „Transportmechanismen von
HIV durch Epithelzellen und Epithelien“ unter der Betreuung von
Herrn Prof. Richard Lucius (Humboldt-Universität, Berlin) und Herrn
Prof. Georg Pauli (Robert Koch-Institut, Berlin).

11.2000 – 04.2006

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Robert Koch-Institut, Fachgebiet
Retrovirologie, jetzt Zentrum für Biologische Sicherheit

Publikationen und Präsentationen

Publikationen	<p>Kracht M, Rokos H, Özel M, Kowall M, Pauli G, Vater J (1999) Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. <i>J Antibiot (Tokyo)</i>. 52(7), 613-9.</p> <p>Uhlenhaut C, Kracht M (2005) Viral infectivity is maintained by an RNA protection buffer. <i>J Virol Methods</i>, 128(1-2):189-91.</p> <p>Helwig M, Wilde C, Vulfson EN, Pauli G, Vater J (2007) Amino acid- and sugar-based monomeric and gemini biosurfactants as novel efficient antiviral agents. Zur Publikation eingereicht.</p> <p>Helwig M, Kücherer C, Ellerbrok H, Pauli G (2007) Identification of an envelope glycoprotein gp120 domain involved in transcytosis of HIV-1 through epithelial cells. Zur Publikation eingereicht.</p>
Posterpräsentationen	<p>Kracht M, Rokos H, Özel M, Pauli G, Vater J (1998) Virus inactivation by lipopeptides produced by <i>Bacillus subtilis</i>. VAAM 1998, Frankfurt, 22.-25.03.1998</p> <p>Kracht M, Pauli G (2003) Antibodies against HIV-1 inhibit the transcytosis of HIV-1 through cells. GfV Jahrestagung 2003, Berlin, 26.-29.03.2003</p>
Vorträge	<p>Kracht M, Pauli G (2003) Wie erreicht HIV seine Zielzelle? Untersuchungen zum Transport von HIV durch Zellen und Zellschichten sowie zur Inhibierung dieses Infektionsmechanismus. Institutsseminar Robert Koch-Institut, 15.10.2003</p> <p>Kracht M, Pauli G (2004) A peptide of 59 amino acids inhibits the transcytosis of HIV-1 through cells. GfV Jahrestagung 2004, Tübingen, 17.-20.03.2004</p>

Eidestaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin bekannt.

Berlin, den 10.04.2006